



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Postgrados de la Facultad de Veterinaria (PPFV)

Efecto de la infusión intrauterina sobre los aspectos endócrinos, histológicos y moleculares endometriales en yeguas.

Efecto de la infusión intrauterina con iodopovidona al 1% en los niveles de progesterona circulante, la histología y expresión endometrial de receptores esteroideos en yeguas sanas.

Irene Kalpokas Tognazzolo

Campo Experimental nº 1, Facultad de Veterinaria.

TESIS DE MAESTRIA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

2010

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	IV
RESUMEN	VII
SUMMARY	VII
ABREVIATURAS	VIII
ANTECEDENTES.....	1
Sistema reproductivo - estacionalidad - ciclo estral.....	1
Progesterona y desarrollo embrionario.....	3
Luteólisis y reconocimiento materno de la preñez	5
El endometrio	7
<i>Estructura.....</i>	<i>8</i>
Receptores esteroideos	9
<i>Estructura.....</i>	<i>9</i>
<i>Mecanismo de acción.....</i>	<i>10</i>
<i>Funciones en el útero</i>	<i>11</i>
<i>Expresión y variación con el ciclo estral y preñez.....</i>	<i>12</i>
Endometritis	15
<i>Diagnóstico</i>	<i>17</i>
<i>Tratamiento.....</i>	<i>18</i>
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Animales y tratamientos.....	23
Muestras de sangre	24
Determinación hormonal.....	24
Abundancia y localización tisular de receptores	24
Análisis de imagen.....	25
Análisis histológico	25
Análisis estadístico.....	25
RESULTADOS	26

Análisis histológico	26
Niveles de P4	27
Receptores.....	28
<i>Aspectos Generales</i>	<i>28</i>
<i>REα.....</i>	<i>28</i>
<i>RP.....</i>	<i>30</i>
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIONES	35
CONSIDERACIONES FINALES	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE FIGURAS y TABLAS

Figura 1.....	3
Figura 2.....	7
Figura 3.....	10
Figura 4.....	14
Figura 5.....	27
Figura 6.....	28
Figura 7.....	29
Figura 8.....	30
Figura 9.....	31
Tabla I	26

**A Vytautas...mi ángel
de la guarda...**

AGRADECIMIENTOS

El presente experimento fue parcialmente financiado gracias a la obtención de una beca de la Comisión de Investigación y Desarrollo Científico (ayudante CIDEDEC 2008) y de la Comisión Académica de Maestrías y Doctorados (becas de apoyo para finalización de estudios de maestrías o doctorados de la UdelaR 2009).

Muchas personas contribuyeron para llevar adelante este trabajo y quisiera agradecer a tanta gente que me acompañó y ayudó en éste camino ...

..a mi tutora, **Dra. Carolina Viñoles**, desde lejos y en los descuentos, aceptó ser mi tutora y sin ello no podría haber comenzado éste trabajo...por su visión analítica: cuestionar cada resultado y discutirlo hasta sacarle la última gota provechosa, por su búsqueda incansable de alternativas, su eficiencia y velocidad de trabajo cuando más se precisa y por sus siempre oportunos "*vamo´arriba*"...

..a mi co-tutor, **Dr. Rodolfo Rivero**, me instruyó en la técnica de biopsia endometrial y evaluación histopatológica, herramientas esenciales para llevar a cabo éste proyecto y que además contribuyeron a mi formación profesional...por la evaluación de las muestras y por ceder su tiempo y su trabajo en una atareada agenda internacional .. por su aporte desde la visión práctica equina y su apoyo...

..a quien no pudo ser mi tutor por cuestiones reglamentarias, pero quien en los hechos lo fue en realidad...al **Dr. Fernando Perdígón**..su enorme generosidad y su fe en mí hicieron factible el proyecto... participó en el diseño experimental e hizo que pudiese acceder entre otras cosas a las instalaciones, las yeguas y al personal idóneo para trabajar con los animales... y a través de él accedí al mundo de los caballos...

..a la **Dra. Ana Meikle**...ha contribuido enormemente a mi formación científica...me contactó con mi tutora y co-tutor, me cedió materiales esenciales para realizar el trabajo de laboratorio, me instruyó en las técnicas correspondientes, pero por sobre todo se hizo un tiempo para poner su cabeza en mi trabajo, y al hacerlo, hizo que yo lo hiciera....

..al personal del Campo Experimental nº 1 (Migues)...a los **Sres. Olivero, Mesa, Salazar, Hernández, Repetto y Quirico**: sin su ayuda sencillamente no hubiese podido trabajar con los animales...a la **Dra. Lucy Sosa**: por ayudarme en lo práctico y a no perder las esperanzas...

..a los colaboradores honorarios de materiales, insumos, instalaciones y/o horas de trabajo: **Dr. Ferraris** (por ceder el predio y animales para practicar en la biopsia), **Dr. Elhordoy** (por cedernos el espéculo), **Dra. Medero** (por proporcionarnos los conectores de suero), **Dr. Moraña** (por la instrucción y procesamiento de las muestras de biopsia), **Dra. Garófalo** (por permitirme utilizar las instalaciones de Bioquímica), **Dra. Pesina y Dr. Breijo** (por el cultivo y procesamiento de las muestras de citología), **Dr. Fila** (por

ayudarme en la evaluación de la citología), **Dr. Bielli y Br. Genovese** (por el procesamiento de las muestras para histopatología), al **personal de DILAVE- Paysandú** (por su colaboración en la evaluación histopatológica), **Dra. Rupechter** (por su colaboración en el RIA), **Laboratorios König** (por proporcionarnos los sedantes), **Laboratorios Intervet** (por proporcionarnos la hCG), **Dra. Cecilia Sosa** (por su enorme ayuda con las figuras), al **Dr. Eduardo Malchinsky** (por sus aportes al diseño y el acceso a bibliografía) y al **Dr. WR Allen** (por el honor de conocerlo y por escuchar mi trabajo).

..a la **Br. Marilina Talmón y Sra. Isabel Sartore**...por el análisis de imagen y por ayudarme a no rendirme en la odisea de la inmunohistoquímica, con todo lo que implicó...por su paciencia y compromiso ...

..a la **Cr. Ana Paula Kalpokas, Lic. Diego Altamirano y Dr. Raúl Leites** (Laboratorios König Uruguay)..por las licencias, el apoyo constante y por dejarme crecer....

..a la **Lic. Carolina Abud**...Carito...mi otra hermana...su visión científica no conformista fue enriquecedora y me dio fuerzas...porque nunca dejó de creer en mí...

..a **mis amigos** ...simplemente por estar ...

..a **mi familia**...la nueva y la de siempre...por el apoyo incondicional..
..a mi hermana **Ana**..mi protectora..su generosidad inagotable que lo abarca todo..

..a mi hermano **Victor**..mi consejero..de tan lejos igual me hizo saber que estaba..

..a mi esposo **Alvaro**..mi compañero del alma..por alentarme y soportarme...

y a **mis padres**...intentando seguir sus enseñanzas y sus principios soy lo que soy...es un orgullo y una bendición ser su hija.

..a todos...MUCHAS GRACIAS..

“El verdadero coraje no es la ausencia de miedo, sino la voluntad de proceder a pesar de ello.”

Mark Twain

RESUMEN

Las infusiones intrauterinas se han utilizado extensamente para el tratamiento de endometritis en la yegua. Sin embargo se desconoce el efecto que ocasionan sobre los niveles hormonales y aspectos moleculares en el endometrio. Se evaluó el efecto de infusiones intrauterinas de una solución de iodopovidona al 1 % sobre los niveles sanguíneos de progesterona, las características histológicas y los niveles y distribución de los receptores endometriales de estrógeno (RE α) y progesterona (RP) mediante inmunohistoquímica. Se sincronizaron 14 yeguas cruce, sanas y 7 de ellas fueron infundidas al día 0 (ovulación) y día 2 post ovulación, en dos ciclos consecutivos. Muestras de biopsia uterina fueron extraídas en el día 6 y 15 post ovulación. La infusión con iodopovidona no indujo una respuesta inflamatoria en el endometrio, ni afectó la intensidad de tinción (IT) o el porcentaje de células positivas (PosT) de RE α . Sin embargo, redujo la PosT de RP el día 6 (epitelio glandular profundo control 95,7 vs. infundidas 61,5, $P < 0.05$), sin afectar la IT. Las yeguas tratadas tuvieron menores niveles de progesterona al día 2 (3.9 ng/ml vs. 6.6 ng/ml, $P = 0.07$), y más altos al día 15 comparadas con los controles (4.4 ng/ml vs. 1.3 ng/ml, $P = 0.07$). Concluimos que una infusión de iodopovidona al 1 % durante los días 0 y 2 post ovulación en yeguas sanas no induce cambios histológicos indicativos de endometritis, pero reduce las concentraciones de progesterona y la expresión del RP al día 6, sin afectar el RE α . Estas alteraciones podrían reducir la sobrevivencia embrionaria.

SUMMARY

Intrauterine infusions have been widely used for the treatment of endometritis in the mare. Nevertheless, their consequences on endocrine and endometrial molecular aspects are unknown. The effect of a 1% povidone-iodine solution intrauterine infusion on progesterone levels, endometrial histology and oestrogen (ER α) and progesterone (PR) receptors distribution by immunohistochemistry, was studied. Fourteen healthy mixed-bred mares were synchronized and seven were infused at days 0 (ovulation) and 2 of two consecutive cycles. Uterine biopsy samples were taken at day 6 and 15 post ovulation. The treatment did not induce an inflammatory response indicating endometritis, neither affected the ER α . However, it reduced the PR percentage of positive cells (PPC) at day 6 (deep glandular epithelium, control: 95.7 vs. infused: 61.5, $P < 0.05$). Treated mares had lower progesterone levels on day 2 (3.9 ng/ml vs. 6.6 ng/ml, $P = 0.07$), and higher levels on day 15 compared with controls (4.4 ng/ml vs. 1.3 ng/ml, $P = 0.07$). We conclude that a 1% povidone-iodine infusion during days 0 and 2 post ovulation in healthy mares does not induce histological changes indicating endometritis, but decreased progesterone concentrations and reduced the expression of endometrial PR at day 6 without affecting the ER α . These changes could reduce embryo survival

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
ADN	Ácido desoxi-ribonucleico
CL	Cuerpo lúteo
COX	Ciclooxigenasa
DAB	3,3'-diaminobencidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Estrógenos
E2	17 β -Estradiol
EPPS	Endometritis persistente post servicio
HRE	Elemento que responde a la hormona
FSH	Hormona folículo-estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
IA	Inseminación artificial
IT	Intensidad de tinción
LH	Hormona luteinizante
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
Ox	Oxitocina
P4	Progesterona
PBS	Solución fosfato salina
PG	Prostaglandina
PosT	Positividad de tinción=porcentaje de células positivas
RE	Receptor de estrógenos
RIA	Radioinmunoanálisis
RMP	Reconocimiento materno de la preñez
RN	Receptor nuclear
RP	Receptor de progesterona

INTRODUCCIÓN

En todo el mundo, los equinos juegan un rol en la cultura humana. La historia de la cría de caballos se remonta a 4500 años antes de Cristo y durante la misma los tipos de equinos criados fueron variando con la cultura, los tiempos y necesidades, con la constante de procurar reproducir ciertas características. A través de los siglos, el caballo ha sido seleccionado basado principalmente en sus habilidades para las guerras, la carga, los deportes y exposición, pero no por su fertilidad. No es extraño entonces que la yegua presente la más baja eficiencia reproductiva de los animales domésticos (Sharma et al. 2010).

Durante las dos últimas décadas, los estudios retrospectivos sobre la fertilidad en yeguas Pura Sangre de todo el mundo revelaron que las tasas de preñez por ciclo van desde 54% a 64% (Sharma et al. 2010). A pesar de las mejoras en los porcentajes de parición, la tasa general de falla en la preñez se mantiene alta y representa una gran pérdida para la industria equina (Morris & Allen 2002).

ANTECEDENTES

Sistema reproductivo - estacionalidad - ciclo estral

El sistema reproductivo se compone de dos grupos de órganos: las estructuras que son intrínsecas al sistema reproductor (ovarios y genitales tubulares) y aquellas estructuras que están físicamente aisladas del tracto reproductivo, pero que desempeñan un papel en la regulación de los eventos reproductivos (la glándula pineal, la retina, el hipotálamo, la glándula pituitaria) (Ginther, 1992).

El aparato reproductor consta de dos ovarios y un aparato tubular, incluyendo los oviductos y los cuernos, cuerpo y cuello del útero, la vagina, el vestíbulo y la vulva. Cuando el óvulo es descargado del folículo durante la ovulación, es recibido a nivel de la bursa del ovario. El oviducto es responsable del movimiento de los espermatozoides y óvulos a un sitio común (la ampolla) para la fertilización. El óvulo fecundado entonces viaja por el oviducto y llega a alcanzar el útero para el soporte gestacional. El útero proporciona el entorno adecuado para que el embrión se desarrolle (Blanchard et al. 2003). Está formado por dos cuernos y un único cuerpo. Visto desde dorsal, tiene forma de "T" o "Y" dependiendo de cómo se distribuya en relación a las vísceras intestinales (Ginther, 1992). El útero está suspendido dentro de la cavidad pélvica y el abdomen por el ligamento ancho (Blanchard et al. 2003).

La capa serosa del útero y la capa vascular más la muscular longitudinal se continúa con el ligamento ancho. El miometrio se compone de una capa circular interna y una capa longitudinal externa. Por último, la capa más interna del útero consiste en el endometrio, que es glandular y secretor (Blanchard et al. 2003).

El lumen uterino en el estado de no preñez normal está prácticamente obliterado por la pared colapsada y los prominentes pliegues del endometrio. Los pliegues del endometrio se disponen longitudinalmente en el útero y suelen ser palpables por el recto cuando el útero es “aplastado” entre el pulgar y dedo índice. El miometrio es bastante grueso y es responsable de la variación en el tono uterino de la yegua durante el estro vs. el diestro o preñez temprana (Blanchard et al. 2003).

La yegua es un animal poliéstrico estacional con fotoperiodo positivo. Es decir, presenta varios ciclos estrales durante la temporada reproductiva, y se encuentra regulada por la cantidad de horas luz (Gigli et al. 2006). El patrón de regulación del ciclo estral depende del delicado balance entre las hormonas producidas por la glándula pineal, el hipotálamo, la glándula pituitaria, los ovarios y el endometrio (Blanchard et al. 2003). El aumento en la luz del día estimula el hipotálamo para aumentar la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), lo que estimula la actividad de las gonadotropinas: la hormona folículo-estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). El ciclo tiene también el control de los factores ováricos: las hormonas 17β estradiol (E₂), inhibina y progesterona (P₄), que a través de la retroalimentación negativa o positiva controlan la liberación de FSH y LH (McMeen, 2002).

El año calendario puede dividirse en cuatro etapas que difieren endócrina y fisiológicamente: etapa anovulatoria, transición de primavera, etapa reproductiva y transición de otoño (Gigli et al. 2006).

Etapa anovulatoria: Durante el invierno, la mayor cantidad de horas de oscuridad, produce una cantidad suficiente de melatonina como para bloquear el eje hipotalámico-hipofisario gonadal. Como consecuencia, la GnRH es liberada con muy baja amplitud y frecuencia, resultando insuficiente para producir la secreción de FSH y LH (Gigli et al. 2006).

Transición de primavera: El inicio de la actividad reproductiva se produce paulatinamente. Durante este período, la concentración de FSH es óptima para producir el reclutamiento de folículos pero al no liberarse LH en cantidad suficiente, no se desencadena la ovulación (Gigli et al. 2006).

Etapa reproductiva: (Fig. 1) El comienzo de la etapa reproductiva sucede cuando las horas luz son suficientes para suprimir el reflejo inhibitorio producido por la melatonina sobre la liberación de GnRH, quien estimula la síntesis de FSH y LH que entran en la circulación. La FSH es responsable del reclutamiento de folículos. Los estrógenos (E) e inhibina producidos por los folículos maduros ejercen un feed-back negativo sobre la FSH, pero los E ejercen un feed-back positivo en la liberación de LH (Gigli et al. 2006). Esta última es responsable de la maduración folicular (y producción de E), ovulación y luteinización del cuerpo lúteo (CL). La P₄ producida por el CL ejerce un feed back negativo sobre la LH (Blanchard et al. 2003).

La duración del ciclo estral en la yegua es entre 19,1 y 23,7 días (Ginther, 1992) pero el promedio en la población es de 21-22 días (Blanchard et al. 2003). Los primeros ciclos del año suelen ser irregulares, adquiriendo más

regularidad a medida que avanza la estación reproductiva. Las fases son el estro, o la fase folicular, y diestro, o la fase lútea. El estro es el período en que la yegua es sexualmente receptiva a un semental y el tracto genital está preparado para aceptar y transportar esperma a los oviductos para la fertilización y varía normalmente entre 4,5 a 8,9 días de duración. En la yegua puede ocurrir una o dos ondas foliculares mayores por ciclo estral. La ovulación ocurre 24-48 horas antes de que finalice el estro. El diestro es el período en que la yegua no es receptiva al semental y el tracto reproductivo está preparado para recibir y nutrir el embrión (Blanchard et al. 2003) y normalmente dura 12,1 a 16,3 días (Ginther, 1992). La fase luteal es iniciada con la ovulación y la generación de un CL secretor de P4 (Gigli et al. 2006).

Transición de otoño: Ocurren cambios paulatinos que van a terminar temporalmente con la activación de folículos y el mecanismo de la ovulación. La concentración sérica de la LH disminuye más rápidamente luego de su aumento pre-ovulatorio y finalmente no logra alcanzar los niveles necesarios para desencadenar la ovulación (Gigli et al. 2006).

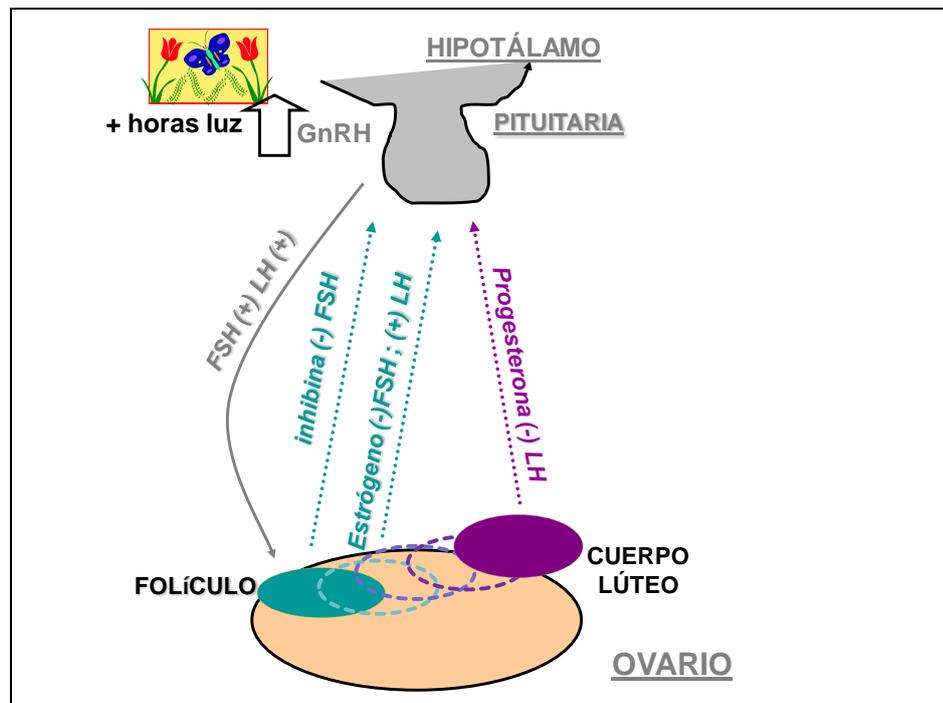


Figura 1. Esquema descriptivo del control hormonal en la etapa reproductiva.

Progesterona y desarrollo embrionario

La P4 es una de las hormonas claves que controlan la función reproductiva. En yeguas, las concentraciones plasmáticas de P4 son bajas durante la fase folicular y el primer aumento ocurre 10-12 horas post ovulación. Los niveles comienzan a elevarse para alcanzar un pico al día 6 post ovulación (Nagy et al. 2004) y, en la yegua no preñada, el CL continúa produciendo P4 hasta el día 14 -15 post ovulación (Squires, 1993).

La secreción de P4 por parte del CL es requerida para la preñez normal en todas las especies domésticas (McMeen, 2002). La P4 actúa en el útero para estimular y mantener la función endometrial necesaria para el crecimiento del concepto, la implantación, la placentación y el desarrollo hasta término (Satterfield et al. 2006).

Después de que el ovocito es fecundado, el embrión resultante pasa a través de la unión uterotubal para entrar en el útero al día 6 después de la ovulación. El embrión, comienza a secretar prostaglandina E2 (PG E2) en el día 5 post ovulación: las propiedades relajantes del músculo liso de la hormona actúan de forma local en la pared del oviducto y por lo tanto permiten que el embrión avance, para entrar en el útero al día siguiente (Allen, 2000).

Entre los días 6,5 y 22 después de la ovulación, el embrión está completamente envuelto por un glicocalix resistente y elástico, conocido como la cápsula del blastocisto. Esta cápsula, impide el alargamiento del trofoblasto entre el día 10 y 16 días después de la ovulación; al contrario de lo que sucede en rumiantes, el embrión equino se mantiene esférico y está completamente desprendido dentro del lumen uterino, moviéndose constantemente recorriendo todo el útero, impulsado por fuertes contracciones peristálticas del miometrio. Este proceso de movilidad persiste hasta el día 17, cuando un aumento repentino y espasmódico en el tono miometrial inmoviliza y "fija" la vesícula todavía esférica en la base de uno de los cuernos (Allen, 2000).

Además de proporcionar fuerza al blastocisto para que pueda soportar las contracciones miometriales que lo propulsan a través del útero, la cápsula es también importante en la regulación del suministro de nutrientes al embrión. Debido a su carga electrostática negativa y a la configuración del glicocalix, la superficie externa de la cápsula atrae otras proteínas. Por lo tanto, la cápsula acumula en su superficie una serie de componentes de las secreciones de las glándulas endometriales a medida que el concepto se mueve a través del útero entre el día 7 y 17 después de la ovulación (Allen, 2000). Grandes cantidades de una proteína de 19 kDa, llamada p19, son secretadas en el lumen uterino de la yegua durante el ciclo estral y la preñez temprana. La p19 se asocia fuertemente con la cápsula acelular que rodea el concepto y se cree que es transportadora de un factor materno necesario para mantener el embrión en desarrollo durante la preñez. Se cree que la secreción de la proteína es P4-dependiente (Crosset et al. 1996).

La cápsula comienza a desintegrarse en los días 20-21 post ovulación, lo que permite el rápido desarrollo de "brazos" de células trofoblásticas en la superficie externa de la membrana coriovitelina que se proyectan hacia las bocas de las glándulas endometriales, tanto para obtener una imbibición eficaz de la secreción glandular así como para dar adhesión física del embrión en el endometrio (Allen, 2000).

Luteólisis y reconocimiento materno de la preñez

La luteólisis, definida como la regresión funcional y/o estructural del CL, es un proceso clave en el ciclo ovárico (Boerboom et al. 2004). En yeguas no preñadas, la prostaglandina (PG) F2 α secretada por el endometrio alrededor del día 15 post ovulación induce la regresión del CL. La oxitocina (Ox) pituitaria es responsable del estímulo de la liberación de la PG F2 α (Starbuck et al. 1998). Por otro lado, el endometrio equino también sintetiza Ox (Behrendt-Adam et al. 1999; Bae & Watson, 2003) y se ha planteado la hipótesis de que ésta sirva para amplificar la producción uterina de PG F2 α durante la luteólisis (Weems, 2006) actuando de una manera parácrina (Bae & Watson, 2003). La estimulación del receptor de Ox genera una cascada de eventos que terminan por activar la fosfolipasa A, resultando en la liberación hidrolítica del ácido araquidónico (AA) de los fosfolípidos de membrana. El AA es metabolizado por la enzima ciclooxigenasa 2 (COX2), para dar la PG H2, quien rápidamente es convertida a compuestos más estables como la PG F2 α (Boerboom et al. 2004).

Existen algunas diferencias en el proceso luteolítico entre yeguas y los rumiantes, entre las más importantes se encuentran: 1) la PG es distribuida sistémicamente en las yeguas debido al poco contacto entre la vena uterina y la arteria uterina; 2) las anomalías uterinas que afectan directamente al mecanismo luteolítico son más comunes en las yeguas, proporcionando un adicional enfoque de investigación y 3) el aumento del E2 secretado por los folículos en crecimiento no es necesario para la luteólisis en yeguas (Ginther, 2009) (Fig. 2 A).

En las especies domésticas, si la concepción no ocurre, la luteólisis debe ser iniciada para permitir el comienzo de un nuevo ciclo ovárico. Por el contrario, la función y la integridad del CL, y por ende la producción de P4, son obligatorias para establecer y mantener la preñez. El embrión por lo tanto, debe anular de alguna manera la luteólisis, un proceso denominado reconocimiento materno de la preñez (RMP) (Boerboom et al. 2004) (Fig. 2 B). El caballo es una de las pocas especies domésticas en la que la/s señal/es concepto-derivadas utilizadas para el RMP no han sido identificadas (Klein et al. 2010). Los équidos parecen ser distintos de los rumiantes y cerdos y presentan algunas características inusuales durante la preñez temprana que probablemente contribuyan al RMP (Klein et al. 2010), como la migración uterina del embrión equino entre los días 7 y 17 después de la ovulación (Allen, 2000). Los conceptos equinos también producen grandes cantidades de E y PG, sin embargo, sus funciones precisas durante la preñez temprana no están claras (Klein et al. 2010). La PG secretada estimularía las contracciones peristálticas locales del miometrio que se requieren para impulsar el concepto durante el período de liberación de la señal del RMP. Los experimentos que intentaron demostrar que los E derivados del embrión son responsables de la extensión de la función del CL no han sido concluyentes (Allen, 2000).

Stout et al. (2004) propusieron a la insulina como candidato para la señal del RMP en la yegua cuando, en un estudio preliminar, se identificó ésta hormona en el medio de cultivo utilizado para la incubación de conceptos de

10 a 18 días. Sin embargo, la insulina administrada diariamente durante los días 7 a 17 del diestro tuvo poco o ningún efecto sobre la ciclicidad y por tanto se concluyó que era poco probable que se tratase de la señal de RMP (Rambags et al. 2008).

La secreción de PG F2 α endometrial se reduce en yeguas preñadas y hay acumulada evidencia de que la interrupción de la función del receptor de Ox contribuye a la anulación de la cascada luteolítica durante la preñez en la especie equina, aunque el mecanismo subyacente no se conoce (Klein et al. 2010). Por otra parte, Booerboom et al. (2004), plantean la hipótesis de que otro posible medio mediante el cual el embrión podría inhibir la luteólisis es alterando la expresión de las enzimas que intervienen en la síntesis de PG. Sus resultados demostraron que la presencia del embrión bloquea la inducción de la expresión de COX 2 en el día 15 post ovulación, y sugieren, al igual que otros autores, que este mecanismo suprime la liberación de PG F2 α del útero y evita la luteólisis (Eisele et al. 2002; Booerboom et al. 2004; Ealy et al. 2009).

Para comprender mejor el complejo proceso de RMP en el caballo, Klein et al. (2010) llevaron a cabo el perfil transcripcional del tejido endometrial del día 13,5 post ovulación de yeguas durante el ciclo estral y yeguas preñadas. En el endometrio en gestación se detectaron 106 genes positivamente regulados y 47 negativamente regulados en comparación con los animales controles. No fue sorprendente que la mayoría de los genes positivamente regulados estén vinculados con la remodelación endometrial en respuesta al concepto y la correcta provisión y transporte de nutrientes al concepto pre implantación (Klein et al. 2010).

El embrión temprano expresa genes de interferón-delta, y ha surgido la hipótesis de que puedan estar implicados en la prevención de la luteólisis, como el interferón-tau en rumiantes (Cochet et al. 2009). Sin embargo, otra línea de investigación concluyó que los interferones en yeguas carecen de un papel de señalización en el RMP o en la luteólisis asociada a la falla de la preñez, dejando su papel durante la preñez temprana desconocido (Walker et al. 2009).

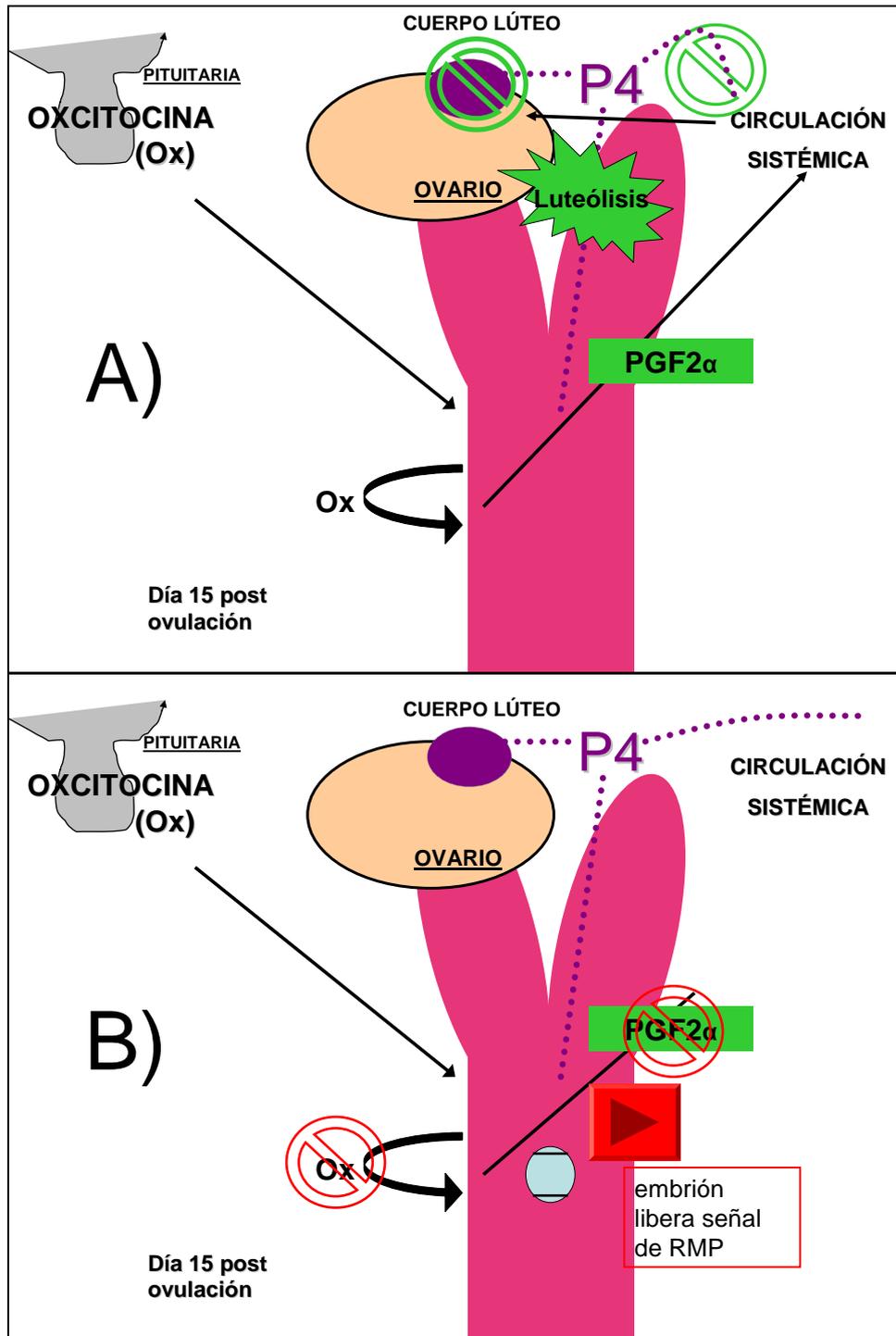


Figura 2. Esquema representativo de A) el proceso luteolítico y B) el reconocimiento materno de la preñez en la yegua. P4: progesterona; PG F2α: prostaglandina F2α; RMP: reconocimiento materno de la preñez.

El endometrio

La composición y la calidad del medio ambiente uterino son determinantes del éxito y la performance reproductiva. El útero es parte del sistema

endócrino: un órgano diana de los esteroides y productor de hormonas. Las hormonas controlan la actividad secretoria uterina cuantitativa y cualitativamente. La sincronía entre las hormonas maternas y el desarrollo embrionario es una condición para establecer la preñez. Antes de la implantación, el embrión es sustentado únicamente por las secreciones que se acumulan en la cavidad uterina, un fenómeno llamado nutrición histotrófica. Por ende, el ambiente uterino es crítico para el continuo soporte y desarrollo del concepto a partir del día 6 post ovulación (Ball, 1993). Además, en la yegua la implantación y la placentación tienen lugar mucho más tarde que en otras especies, por lo tanto, el histotrofo es particularmente importante en los equinos (Reilas, 2001). Un inadecuado ambiente uterino causa mortalidad embrionaria, que tiene una alta incidencia en los caballos (Reilas, 2001).

Estructura

El endometrio equino es un tejido complejo compuesto de varios tipos celulares: epitelio luminal y glandular, estroma y vasos.

El epitelio luminal se compone de una sola hilera de células que varían en altura desde cuboidal baja a columnar alta dependiendo de la etapa del ciclo estral. A veces el epitelio se muestra pseudoestratificado. Las aperturas de las glándulas endometriales se pueden ver periódicamente en la superficie del epitelio luminal. Células epiteliales ciliadas anillan éstas aperturas. Una membrana basal separa el epitelio luminal de la lámina propia subyacente (Van Camp, 1988). El epitelio luminal es la "interfase funcional" entre el útero y el mundo exterior y una vez que se establece la preñez, el epitelio luminal está directamente adjuntado al trofoblasto placentario a través de microvellosidades (placentación epiteliochorial) (Schlafer, 2007).

La lámina propia se subdivide en la capa de estrato compacto, que consiste en un tejido estromal denso (superficial) justo debajo de la membrana basal, y el estrato esponjoso (profundo), tejido menos denso entre el estrato compacto y el miometrio. El estrato compacto contiene numerosos capilares subepiteliales y los cuellos de las glándulas endometriales (Van Camp, 1988). El estroma superficial es altamente vascularizado y es por lo tanto un importante sitio de exocitosis y acúmulo de células inflamatorias. Las capas superficiales del endometrio sufren cambios dramáticos durante la preñez y la involución uterina (Schlafer, 2007). El estrato esponjoso contiene células del estroma, vasos sanguíneos, nervios, linfáticos, y la mayor parte de las glándulas (Van Camp, 1988).

En combinación con el epitelio luminal, el epitelio glandular sirve para producir y liberar una serie de secreciones biológicas complejas (fluidos uterinos, leche uterina, histotrofo) que varían dependiendo del estadio del ciclo y preñez. El daño físico o la asincronía funcional de las células epiteliales están asociados con subfertilidad (Schlafer, 2007).

Receptores esteroideos

Tal como se describió, el endometrio equino es un tejido compuesto de varios tipos celulares que sufren variaciones cíclicas, ya que responden a las hormonas esteroideas sexuales (Aupperle et al. 2000). Las hormonas esteroideas están integradas a cada aspecto de la fisiología reproductiva mamífera en ambos sexos, incluyendo el desarrollo sexual, la gametogénesis, el control hipotalámico-pituitario de la función gonadal, el comportamiento sexual y maternal, la preñez y la lactación (Couse et al. 2006). Tanto el E2 (el más importante de los E debido a su potencia biológica) (Sosa, 2007), como la P4 median cambios dramáticos en los tejidos reproductivos de la yegua durante el ciclo estral y la preñez temprana (Ginther, 1992). Las acciones de estas hormonas están mediadas por receptores situados en los núcleos celulares. Las hormonas esteroideas atraviesan el citoplasma, se unen a sus receptores, y estos complejos ligando-receptor sirven como factores de transcripción que interactúan con el ácido desoxi-ribonucleico (ADN) directamente para regular la expresión génica, regulando el crecimiento y la diferenciación endometrial (Aupperle et al. 2000; Hartt et al. 2005).

Estructura

Los receptores esteroideos son parte de la familia de receptores nucleares (RN). Los miembros de la familia RN cumplen con una plétora de funciones y son parte integral del desarrollo y mantenimiento de múltiples sistemas fisiológicos (Couse et al. 2006).

EL receptor de P4 (RP) de conejo y de pollo fueron los primeros en clonarse en 1986. Dos promotores diferentes en el gen de la P4 proveen la generación de dos isoformas principales del RP, RP-A (94 kDa) y RP-B (114 kDa), en la mayoría de las especies excepto el conejo, que posee sólo RP-B. Una tercer isoforma, denominada RP-C, fue descubierta recientemente en los seres humanos (Couse et al. 2006).

El receptor de estrógeno alfa (RE α) humano fue clonado primero en 1985. Un segundo gen de RE, denominado ESR2 (RE β), fue descubierto en 1996 en la rata y humanos y desde entonces ha sido clonado en casi 20 especies. A diferencia del RP, el RE α y RE β no son isoformas sino distintas formas de receptor codificada por diferentes genes (Couse et al. 2006).

Común a todos los miembros de la familia de los RN es una estructura modular de dominios, cada uno de los cuales aloja una función autónoma que es crítica para la acción total del receptor. Los receptores esteroideos sexuales están compuestos por módulos funcionales: un dominio N-terminal o dominio A / B, el dominio de unión al ADN, una región bisagra y un dominio de unión al ligando. Los RE también poseen un dominio F C-terminal (Couse et al. 2006).

Mecanismo de acción

Nuestra comprensión de los mecanismos por los cuales las hormonas esteroideas y sus afines receptores intracelulares influyen en la función celular se amplió profundamente desde la revisión de éste campo por Clark y Markaverich en 1988. Gran parte de la información sigue siendo contemporánea en referencia a la bioquímica general del receptor y su activación ligando-dependiente, ahora conocida como el modelo "clásico" de activación. El modelo clásico de acción del receptor esteroideo (Fig. 3) implica un receptor que se encuentra en el núcleo o en el citoplasma pero que es secuestrado por un complejo multiproteico inhibitorio en ausencia de la hormona. El ligando esteroideo lipofílico es capaz de difundir libremente a través de la membrana plasmática y nuclear y se une a su receptor afín. La unión del ligando resulta en un cambio de conformación en el receptor, transformándolo en estado "activo", es decir, está ahora disponible para la homodimerización, el aumento de la fosforilación y la unión a un elemento que responde a la hormona (HRE) dentro del gen promotor diana. El complejo ligando-receptor unido al HRE interactúa con el aparato de transcripción general tanto directa como indirectamente a través de proteínas cofactores para promover la transcripción del gen objetivo (Couse et al. 2006) para producir RNA mensajeros (mRNA). Los mRNA son traducidos en los ribosomas citoplásmicos produciendo proteínas que influyen en la función celular. Una vez que el complejo hormona-receptor interactuó con un gen, el receptor sufre reacciones que resultan en su reciclaje o destrucción (Sosa, 2007).

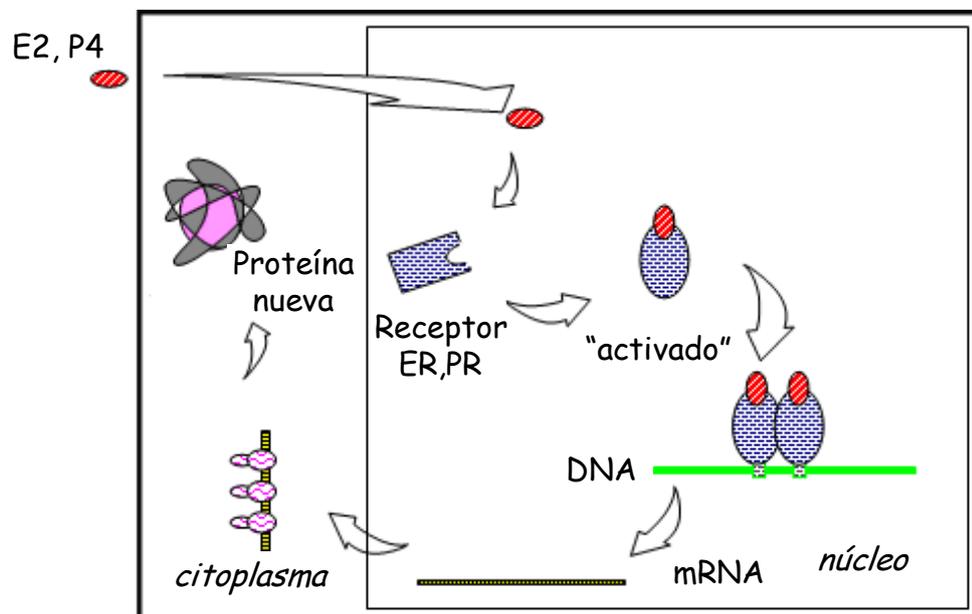


Figura 3. Mecanismo de acción de los receptores esteroideos (Fuente: Meikle, 2001).

A lo largo de los años, varios descubrimientos iluminaron la complejidad de la señalización de los receptores esteroideos y salieron a la luz mecanismos

alternativos de señalización del receptor que divergen del modelo clásico. Estos incluyen la interacción ("cross-talk") con sistemas intracelulares y segundos mensajeros que permiten la activación del receptor en ausencia de ligandos esteroideos afines; la unión de los receptores esteroideos a factores de transcripción heterólogos unidos a ADN para proveer la regulación de genes que carecen de secuencias HRE dentro de su promotor, y la señalización de membrana plasmática, a menudo referida como acción de esteroideos "no genómica". La existencia de múltiples vías de señalización de los receptores probablemente explique el fino control y la plasticidad de las respuestas de los tejidos a los esteroideos sexuales (Couse et al. 2006).

Análisis estructurales de los receptores permitieron conocer las acciones agonistas/antagonistas de ligandos endógenos o sintéticos. Ciertos ligandos poseen una actividad "mixta" agonista/antagonista que depende del receptor, la célula, y el contexto del promotor. La unión del receptor al agonista genera un arreglo de la estructura del dominio de manera que el mismo favorece el reclutamiento de co-activadores. En contraste, un antagonista induce un reposicionamiento incompatible con el secuestro de coactivadores lo que hace poco probable que se active la transcripción. Las aplicaciones de éstos últimos, sobre todo de los antiprogestágenos, son abundantes en medicina reproductiva humana y están vinculados a la contracepción (Couse et al. 2006).

Funciones en el útero

Las hormonas sexuales esteroideas ovárico-derivadas dictan el ciclo estral o menstrual uterino en mamíferos y por lo tanto son esenciales para el establecimiento y mantenimiento de la preñez. La disrupción de los mecanismos de señalización para cualquiera de los esteroideos gonadales lleva a una reducción en la fecundidad, si no a la infertilidad, debido a aberraciones en múltiples sistemas orgánicos. Por ende, una mejor comprensión de los receptores esteroideos en términos de su expresión en tejidos endócrinos y reproductivos, su mecanismo de acción, su rol en los procesos reproductivos y sus interacciones con mecanismos de señalización no esteroideos es instrumental para nuestra habilidad para manejar la infertilidad y enfermedades reproductivas (Couse et al. 2006).

El apareamiento y la fecundación requieren la presencia de E2, que permite que el aparato reproductor se vuelva lubricado y flácido, a la vez que conduce el comportamiento reproductivo, mientras que la P4 permite la formación de glándulas endometriales funcionales, que sintetizan, secretan y transportan el histotrofo (Hartt et al. 2005). Las proteínas endometriales, cuya secreción es P4-dependiente, son especialmente importantes como medio de nutrición y sostén en la especie equina, ya que el concepto no comienza a formar una unión estable con el endometrio hasta el día 40-42 después de la ovulación. Por otra parte, entre los días 6 y 22 post ovulación, el concepto se encuentra rodeado de la cápsula, que va absorbiendo las secreciones de las glándulas endometriales. La proteína p19, se encuentra

en grandes cantidades en las secreciones endometriales y su mRNA fue localizado en el epitelio luminal y glandular de la yegua (Crosset et al. 1996).

En la mayoría de los mamíferos, los E estimulan la proliferación y diferenciación epitelial en el útero mientras que el aumento postovulatorio de P4 en la circulación causa un proceso complejo que implica la proliferación y diferenciación masiva del estroma endometrial (Couse et al. 2006). Contrariamente, la proliferación endometrial equina debería ser dividida en 2 fases: la proliferación estromal durante el pre-estro y estro y la proliferación epitelial durante el diestro (Aupperle et al. 2000) (Fig. 4). Similares resultados respecto a la singular proliferación endometrial equina fueron reportados por Brunkhorst et al. (1991) y Raila et al. (1998). Los anteriores autores observaron la mayoría de las mitosis en las glándulas durante la fase temprana del diestro y en las células estromales durante el estro. Bajos niveles de E2 y máximos niveles de P4 durante el diestro temprano (día 5 post-ovulación) están asociados a la máxima expresión del antígeno Ki 67 en células epiteliales. Este último constituye un marcador de proliferación expresado por las células, una proteína nuclear presente en todas las etapas activas del ciclo celular, pero ausente en la fase G₀ (Aupperle et al. 2000).

Expresión y variación con el ciclo estral y preñez.

La acción de una hormona en el tejido está mediada por interacciones con su receptor a nivel celular, por lo tanto, la respuesta celular a la hormona (o sensibilidad) está dada en parte por la concentración de receptores específicos en dicho tejido. La modulación de la concentración de estas proteínas constituye el paso más importante en el control de las respuestas celulares (Sosa et al. 2006).

Las hormonas esteroideas ováricas son importantes moduladores de sus propios receptores (Sosa, 2007). Las hormonas pueden inducir la síntesis (“up regulation”) de sus propios receptores o los de otras hormonas. A la inversa, pueden regular a la baja la expresión del receptor (“down regulation”), mediante la inactivación del mismo, la inhibición de su síntesis y/o de la estimulación del recambio (Meikle et al. 2000b). Además, los tejidos diana usualmente mantienen un contenido de receptor constitutivo que probablemente sea controlado por mecanismos genéticos (Meikle, 2001).

Por otro lado, diferentes tipos celulares en el endometrio responden de diferentes maneras al mismo estímulo hormonal y se han descrito las variaciones cíclicas en los niveles de receptores en animales y humanos (Aupperle et al. 2000). Comprender la expresión temporal y espacial de los RE y RP en el útero de la yegua es crítico para entender los eventos fisiológicos que ocurren en el útero durante la transición de los recurrentes ciclos estrales al establecimiento de la preñez. Los estudios en ovinos, cerdos y yeguas (Tomanelli et al. 1991; Watson et al. 1992; McDowell et al. 1999; Hartt et al. 2005) han demostrado niveles de mRNA y proteínas de RE y RP relativamente altos en endometrio durante el celo, cuando los niveles

periféricos de E son altos, y niveles relativamente bajos durante mediados y finales de diestro, cuando los niveles circulantes de P4 son altos. Sin embargo, la sensibilidad endometrial a las hormonas esteroideas parece ser diferente entre las células epiteliales y estromales (Aupperle et al. 2000). En los ovinos, los E generalmente aumentan y la P4 disminuye la expresión en el epitelio endometrial. Por otra parte, debido a la variabilidad en la longitud de celo, el momento de la ovulación, y la regulación de luteólisis en la yegua (Allen, 2000), el aumento y disminución temporal de los E y P4 difiere de los rumiantes (Hartt et al. 2005). Podemos decir entonces, que la expresión del RE y RP a nivel endometrial en la yegua está cercanamente relacionada con las concentraciones hormonales plasmáticas periféricas. Siguiendo el patrón de proliferación, el aumento de E2 durante el pro-estro y estro induce la expresión sincrónica de RE y RP en las células estromales y los bajos niveles de E2 y máximos niveles de P4 (día 5 post ovulación) están asociados a la máxima expresión de los receptores esteroideos en células epiteliales (Brunkhorst et al. 1991; Tomanelli et al. 1991; Aupperle et al. 2000) (Fig. 4).

En lo que respecta a la preñez y similar a otras especies domésticas, existe un bloqueo funcional del aumento de la expresión de RE y RP en yeguas preñadas a partir del día 11 de gestación (Hartt et al. 2005). Los niveles de RE y RP en el endometrio son mayores en las yeguas cíclicas durante el momento en que se produce la luteólisis, mientras que durante la preñez, los niveles tanto de las proteínas como del mRNA de RE y RP se mantienen bajos. Estos cambios podrían resultar directamente de la presencia del embrión, o indirectamente de la evolución del patrón de producción de E y P4 que acompaña luteólisis, o ambas cosas (Hartt et al. 2005). Algunos autores plantean que una disminución en los RE estaría vinculada a una disminución de los receptores de Ox, necesaria para evitar la luteólisis, tal como se describe en rumiantes (Klein et al. 2010). Por otra parte, aunque existe una variedad de estrategias para la implantación en mamíferos, un aspecto común es el requisito de que la P4 disminuya sus propios receptores en el epitelio uterino a partir del día 11-13 post ovulación (Bazer et al. 2009) (Fig. 4).

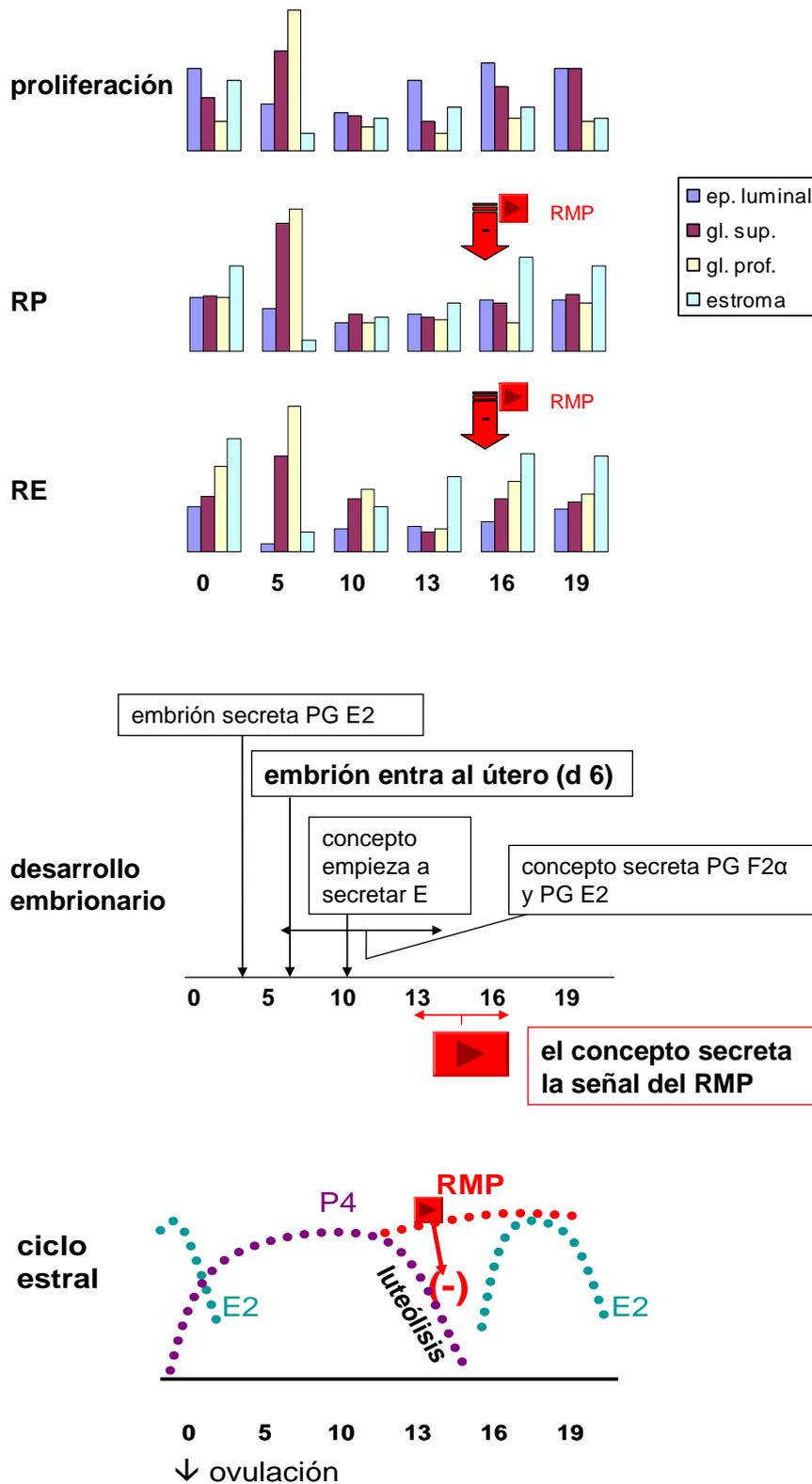


Figura 4. Esquema descriptivo de eventos paralelos del ciclo estral (dinámica hormonal), desarrollo embrionario, niveles endometriales de receptores esteroideos y proliferación endometrial. E: estrógeno; E2: estradiol; ep. luminal: epitelio luminal; gl.sup: glandular superficial; gl.prof.: glandular profundo; P4: progesterona; PG: prostaglandina; RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona; RMP: reconocimiento materno de la preñez. Fuentes: Allen, 2000; Aupperle et al. 2000.

Endometritis

Además de centenares de años de selección no orientada a la fertilidad, existe otro contribuyente a la baja eficiencia reproductiva en la yegua: la endometritis. Esta patología fue identificada como el 3º desorden más común en equinos adultos, luego del cólico y enfermedades respiratorias (Traub-Dargatz et al. 1991).

La endometritis ha sido en los últimos 40-50 años y sigue siendo una de las principales causas de infertilidad en la yegua (Doig et al. 1981; Keller et al. 2004; Troedsson, 2006; Liu & Troedsson, 2008) y uno de los mayores problemas de la reproducción equina, causando sustanciales pérdidas económicas (Concha-Bermejillo & Kennedy, 1982). Las pérdidas pueden presentarse como fallas en la concepción, pérdidas embrionarias tempranas, pérdidas fetales tempranas, abortos de mitad de gestación, placentitis, nacimientos de neonatos sépticos, metritis post-parto o demoras en el retorno a la ciclicidad (LeBlanc & Causey, 2009).

En el pasado, la enfermedad se creía era exclusivamente el resultado de la contaminación bacteriana del útero. En 1969, Hughes y Loy demostraron que las yeguas jóvenes reproductivamente sanas poseían una resistencia natural a una infección inducida experimentalmente. Llegaron a la conclusión de que los componentes locales de los mecanismos de defensa del útero eran responsables de la eficaz y rápida resolución de la infección en las yeguas con resistencia natural. Las yeguas que no lograban despejar el útero de la infección natural fueron clasificadas como susceptibles a endometritis persistentes (Troedsson, 2006).

Investigaciones más recientes sobre los mecanismos de defensa uterina ha aumentado nuestra comprensión de la fisiopatología de la endometritis equina. En 1995, Troedsson propuso la división de la endometritis en la yegua en cuatro categorías: endometrosis o endometritis degenerativa crónica, enfermedades de transmisión sexual, endometritis infecciosa crónica y la endometritis persistente post servicio (EPPS). Por lo tanto, adicionales agentes causales han sido identificados, y se ha aprendido a separar las infecciones uterinas de la endometritis “fisiológica” inducida por reproducción, derivada de la exposición uterina al semen (Troedsson, 2006).

Todos los eventos reproductivos se asocian con contaminación uterina. El coito, el parto y los eventos que le siguen producen una gran oportunidad para que los microorganismos del ambiente migren hacia el tracto reproductivo. La contaminación externa también se produce a causa de una mala conformación perineal asociada con el estado general, la anatomía y/o integridad de los órganos reproductivos internos. A pesar de la introducción habitual de patógenos en el útero, la endometritis persistente se dará si la yegua falla en resolver la inflamación (LeBlanc, 1998).

El útero de la yegua se mantiene libre de contaminantes por mecanismos físicos, inmunológicos y un sistema linfático funcional. Las barreras físicas que impiden el acceso de los microorganismos en el útero son la vulva, la tapa-vestíbulo vaginal y cuello uterino. En la especie equina, sin importar el método de la cobertura, el semen se deposita en la luz del útero. Por lo tanto, en este punto, se superan las barreras físicas. Las proteínas de los

espermatozoides y del plasma seminal y las bacterias del semen y del pene del semental son responsables de la inducción de una respuesta inflamatoria aguda (Malschitzky et al. 2007). Se trata de una reacción fisiológica contra el material extraño entrando en el útero, en este caso esperma, bacterias y/o diluyentes de semen (si se realiza inseminación artificial -IA-) (Knutti et al. 2000).

El útero responde rápidamente a la presencia de semen a través de los neutrófilos, que son identificados en el útero a los 30 minutos de la cobertura (Malschitzky et al. 2007). En yeguas, el tejido endometrial tiene todos los componentes del tejido linfoide asociado a la mucosa. La dinámica de las poblaciones de leucocitos no es sólo una forma de remodelación de tejidos y/o de mecanismos de defensa en el tracto reproductivo, sino que también producen citocinas y quimiocinas. Estas actúan como "hormonas inmunes" en respuesta al desafío de esperma o cambios endócrinos durante el ciclo estral (Fumuso et al. 2007). Esta respuesta inflamatoria tiene por objeto eliminar el exceso de esperma y los espermatozoides defectuosos o muertos. La reacción inflamatoria es acompañada por la acumulación de líquido intrauterino. Sumado a lo anterior se presenta la contractilidad del miometrio, un mecanismo importante para la rápida eliminación del agente causal y los productos inflamatorios, esencial para la limpieza física de la luz del útero (Malschitzky et al. 2007). Tanto la respuesta inflamatoria transitoria, como las contracciones uterinas, deben existir para efectivamente limpiar el útero antes del descenso del embrión (6 días luego de la ovulación) (LeBlanc, 2003).

El cuadro de endometritis es pasajero en yeguas sanas, denominadas resistentes, que son capaces de eliminar los agentes bacterianos y productos inflamatorios del lumen uterino en pocas horas. Las yeguas que fallan en resolver esta endometritis aguda y permanecen afectadas son denominadas susceptibles (Keller et al. 2004; Troedsson, 2006). Las yeguas normales son capaces de superar la endometritis en un plazo de 12 a 48 horas. Sin embargo, la condición puede convertirse en persistente en yeguas con retraso en el aclaramiento del útero. Las yeguas susceptibles acumulan fluido uterino y retienen el edema endometrial por 3 a 5 días post inseminación (Causey, 2006; LeBlanc & Causey, 2009).

La EPPS tiene un impacto negativo sobre la fertilidad ya que el fluido intrauterino retenido interfiere con la supervivencia del embrión y la inflamación persistente incluso puede causar la luteólisis prematura seguida por la pérdida embrionaria temprana (Knutti et al. 2000). La tasa de mortalidad embrionaria es tres veces mayor en las yeguas con esta condición (Malschitzky et al. 2007).

La EPPS es una condición médica común de las yeguas adultas, ocurriendo en aproximadamente el 15% de las yeguas de cría (Zent et al. 1998; Troedsson, 2006) y la principal razón del fracaso en la concepción (Gutjahr et al. 2000), por lo que es una causa importante de pérdidas para el industria equina. Debido a su asociación con la disminución de la fertilidad, es de gran preocupación para los criadores y veterinarios (Maischberger et al. 2008).

Diagnóstico

La importancia de la identificación de yeguas susceptibles a EPPS radica en la necesidad de instaurar un tratamiento para lograr la preñez (Malschitzky et al. 2007). El diagnóstico de endometritis se basa en la historia de la yegua, examen físico y reproductivo, incluyendo la ecografía, la exploración vaginal, examen cervical y diagnóstico de laboratorio. Este último incluye el cultivo, la citología, biopsia endometrial y, en algunos casos, la evaluación endoscópica de endometrio (Maischberger et al. 2008; LeBlanc & Causey 2009).

Antes de la ecografía, era difícil determinar la presencia, y mucho menos el carácter y la cantidad de líquido presente en el útero de yeguas. Desde su introducción, el uso de la ecografía en la reproducción ha hecho un profundo impacto en nuestra capacidad para detectar la presencia de líquido intrauterino en la yegua, así como su gravedad, incluso en etapas anteriores a la infección uterina (Liu & Troedsson, 2008). La acumulación de fluido en el útero es uno de los signos cardinales de una yegua susceptible a EPPS. La acumulación de fluido es tanto un precursor como una secuela de una infección (Causey, 2006). Este líquido indica que la yegua tiene alguna deficiencia en su capacidad física de limpieza y se observó que, entre otros parámetros, es lo que presenta mayor concordancia con la EPPS (Malschitzky et al. 2007). Bajo condiciones experimentales, la yegua se considera susceptible cuando no es capaz de acabar con el proceso inflamatorio en un máximo de 96 horas después de una inoculación bacteriana o IA (Troedsson, 2006). Sin embargo, en los haras, este método no es práctico. La presencia de líquido uterino 48-96 horas post-cobertura se puede considerar como un parámetro diagnóstico de EPPS pero las yeguas con acumulación de líquido en éste momento tienen mucho menores tasas de preñez y mayores tasas de muerte embrionaria. Por tanto, el diagnóstico en este momento, puede resultar tardío y en consecuencia, en un mayor costo y menor éxito. En estos casos, se considera indicador clínico de la susceptibilidad, el acumulo de fluido antes del servicio, especialmente cuando supera los 20 mm. (Malschitzky et al. 2007).

Un complejo de factores microbianos y de la propia yegua contribuye a la patogénesis de la endometritis. Como resultado, los signos clínicos varían mucho de un caso a otro. Los signos clínicos distintivos de la endometritis incluyen tal como se mencionó, la acumulación de líquido intrauterino pero también la vaginitis, flujo vaginal, intervalos cortos entre celos, la citología o biopsia uterina con neutrofilia y el cultivo positivo; todos indican claramente la inflamación del útero. Aunque el diagnóstico a menudo puede realizarse fácilmente, en algunos casos la endometritis puede ser difícil de detectar. En otras palabras, algunas yeguas pueden "esconder" la endometritis y éstas yeguas con endometritis subclínica pueden no presentar alguno o ninguno de los signos clínicos. Por ejemplo, no todas las yeguas con endometritis subclínica acumulan líquido durante el celo o después del servicio y algunos pueden presentar patrones anormales de edema. Sin embargo, ya sea un cultivo positivo o una la citología o biopsia con neutrofilia por sí solos indican una yegua con endometritis subclínica (LeBlanc & Causey 2009).

Una biopsia endometrial es una herramienta valiosa no sólo para la identificación de la causa de la endometritis clínica y subclínica, sino también para la determinación del éxito del tratamiento (LeBlanc & Causey 2009). Las biopsias endometriales pueden ser clasificadas de acuerdo a un sistema de categorización histopatológico propuesto en 1986 por Kenney y Doig (Van Camp, 1988). Dependiendo del grado de inflamación, fibrosis y degeneración glandular presente en el endometrio, las yeguas son asignadas a una de cuatro categorías (I, IIa, IIb y III) y cada categoría se relaciona en forma inversa con el porcentaje de preñez previsible (Nielsen, 2005).

Al comparar el hisopo endometrial y la biopsia como procedimientos diagnósticos para la obtención de muestras citológicas y para cultivo, la biopsia endometrial resultó ser un método más sensible y específico (Nielsen, 2005). La presencia de neutrófilos (infiltración de ≥ 3 por campo de 400x) en la biopsia endometrial es considerada el mejor estándar para el diagnóstico de endometritis agudas (LeBlanc et al. 2007). El diagnóstico mediante otras técnicas como el examen del lavado de útero puede ayudar a identificar yeguas con endometritis subclínica (LeBlanc & Causey 2009). Ball et al. (1988) informaron por primera vez el uso del análisis del lavado uterino de bajo volumen para la identificación de los patógenos y la respuesta inflamatoria, con un énfasis en las yeguas estériles y subfértiles; estudios más recientes mostraron que ésta herramienta es muy útil también en la detección de endometritis crónica (LeBlanc et al. 2007).

Tratamiento

Como se mencionó anteriormente, en el pasado, la enfermedad se creía era exclusivamente el resultado de la contaminación bacteriana del útero. Por lo tanto, las estrategias de tratamiento se centraban en la prevención de la entrada de bacterias en el útero y la administración de antibióticos (Troedsson, 2006). Con el avance del conocimiento sobre los mecanismos de defensa uterina y la fisiopatología de la endometritis equina, nuevos enfoques terapéuticos han sido desarrollados y el tratamiento de la EPPS sigue siendo objeto de continuas investigaciones.

Los lavados uterinos son probablemente la mejor manera de lograr la limpieza física del útero (Malschitzky et al. 2007). El objetivo del tratamiento es eliminar acúmulos de líquido, contaminantes y productos inflamatorios dentro de las 96 horas post monta, asegurando que el embrión encuentre un ambiente endometrial sano al 6 post ovulación, cuando entra al útero (Maischberger y col., 2008). Las infusiones intrauterinas han sido usadas para promover el estro en la yegua tan tempranamente como en 1935, cuando Zwaenepoel y Royer infundieron un litro de agua a 50 °C para el tratamiento del anestro (Neely et al. 1975). El lavado uterino como terapia antimicrobiana fue utilizado por primera vez y descrito por veterinarios de Rusia en 1938. Se reportó como un excelente medio para la eliminación de *E. coli* y *S. zooepidemicus*. La confirmación de éste hallazgo fue seguido por el Dr. Varadin de Yugoslavia, que informó acerca del éxito de ésta estrategia

en yeguas con endometritis en el Primer Simposio Internacional de Reproducción Equina en 1975. Posteriormente, su uso en América del Norte ha aumentado de manera espectacular, sobre la base de modificaciones del procedimiento, las experiencias y los prometedores resultados obtenidos a través de ésta técnica (Liu & Troedsson, 2008). Una importante contribución al uso del lavado uterino fue el estudio de Brinsko et al. (1990), quienes reportaron que el lavado de una yegua 4 horas después de la monta no tuvo efectos adversos sobre la tasa de preñez (Liu & Troedsson, 2008). La aplicación de tratamientos post cobertura, sin deterioro de la fertilidad, es posible debido a las peculiaridades de la yegua, como la posición más baja del oviducto en relación al útero y la existencia de un esfínter en la unión útero-tubárica. Además, los espermatozoides capaces de lograr la fertilización están protegidos en el istmo de la trompa de Falopio. Treinta minutos después de la IA se han observado espermatozoides en las trompas de Falopio, y el transporte se completa a las 4 horas (Malschitzky et al. 2007). Esto da al profesional una flexibilidad importante en el tiempo de tratamiento de las yeguas con endometritis bacteriana y/o EPPS y aquellas con retraso en el clearance uterino (Liu & Troedsson, 2008).

La eliminación total de líquidos y contaminantes debe ser el objetivo del tratamiento de la endometritis. Los lavados uterinos y el uso de fármacos uterotónicos se reportan como tratamientos eficaces. El lavado uterino se realiza usualmente dentro de las 24-48 horas después del servicio o de la inseminación (Knutti et al. 2000) aunque las yeguas con fluido uterino previo al servicio también deben ser irrigadas ya que el mismo afecta adversamente a la motilidad de los espermatozoides y la fertilidad (LeBlanc & Causey, 2009).

El lavado uterino es una herramienta terapéutica extremadamente útil que puede ser aplicada en numerosos problemas reproductivos en la yegua. La mejora de las propias defensas uterinas y la remoción mecánica de contaminantes uterinos son las principales ventajas sobre otras terapias, incluyendo agentes ecbólicos como la oxitocina y PG (Brinsko, 2001). Las razones para utilizar el lavado uterino serían: 1) reducción del número bacteriano y remoción de exudado del lumen uterino, 2) mejoramiento del clearance de contenidos uterinos mediante estimulación de las contracciones uterinas y 3) reclutamiento de neutrófilos y opsoninas mediante la inducción de una irritación transitoria en el endometrio. Incluso, realizar el lavado del útero antes de administrar antimicrobianos intrauterinos probablemente mejore la respuesta al tratamiento (Brinsko, 2001).

En lo que respecta a los efectos endócrinos de las infusiones intrauterinas, varios estudios aportaron datos acerca de la influencia del tratamiento con solución salina en la función luteal y el ciclo estral en la yegua. Debido a que el objetivo buscado en dichos ensayos era acortar el ciclo estral, los mismos se llevaban a cabo con un CL de por los menos 4 o 5 días. Las infusiones realizadas a partir del día 5 post ovulación lograban acortar el intervalo interovulatorio y las concentraciones plasmáticas de progesterona comenzaban a disminuir un día después, para llegar a valores menores a 1 ng/ml en 4 días (Neely et al. 1975). Cuando se probó el efecto de la variación de la temperatura, la osmolaridad y el pH de las soluciones salinas en el útero se observó que la disminución del pH a 3 provocó una

significativa liberación de PG F2 α del útero durante la primera hora después de la infusión, y la fase lútea fue acortada, lo que sugiere que el pH es el principal factor en la obtención de la liberación de PG F2 α a través de la infusión intrauterina de una solución salina (Pascoe et al. 1989).

A través de los años la infusión intra uterina se ha utilizado con una variedad de soluciones. El plasma homólogo ha sido utilizado como tratamiento de la infertilidad bajo la consigna de que las opsoninas suplementarias incrementan la fagocitosis de bacterias (Waelchli et al. 1987). Pero sobre todo, las infusiones han sido ensayadas con una amplia gama de antibióticos y antisépticos. Estas sustancias han oscilado entre agentes tales como el queroseno, limpiadores para pisos, cloro y soluciones de yodo hasta los antibióticos potentes. Desgraciadamente, muchos de estos tratamientos se establecieron sin el conocimiento de su eficacia o sus posibles consecuencias negativas (Brinsko, 2001).

Numerosos agentes han sido utilizados como curetaje químico para el tratamiento incluyendo dimetilsulfóxido (DMSO), peróxido de hidrógeno, sulfato de magnesio, filtrado de *Streptococcus*, queroseno, desinfectantes diluidos (solución de yodo povidona) (Liu & Troedsson, 2008), diacetato de clorhexidina y solución de Lugol al 2% (Olsen et al. 1992). Los informes disponibles, anecdóticos o en la literatura, sugieren que hay un efecto beneficioso en el tratamiento de la endometritis crónica (Liu & Troedsson, 2008).

La terapia de contrairritación está dirigida a estimular la inflamación aguda a fin de resolver los procesos inflamatorios crónicos y degenerativos. La infusión intrauterina estimula la producción de PG, la actividad del miometrio y la evacuación de las glándulas endometriales. El ácido acético diluido (vinagre) disminuye el pH uterino y por lo tanto induce la liberación de PG. El uso intrauterino de DMSO se ha investigado y su acción higroscópica resulta en la deshidratación y descamación superficial de las células epiteliales, lo que lleva a la mejora de la arquitectura del endometrio.

Hay poca información disponible sobre el uso de desinfectantes en el endometrio equino. Según la evaluación realizada por estudios histológicos de biopsias endometriales, repetidos lavados uterinos con una solución de clorhexidina al 0,25% no dañaron el útero. A modo de comparación, el lavado sinovial con clorhexidina al 0,05%, la menor concentración bactericida, ha demostrado ser perjudicial. Los informes anecdóticos de la utilización de queroseno intrauterino son comunes. El efecto beneficioso del queroseno es transitorio, y en general el rendimiento reproductivo no se ve afectado. Es posible que los componentes aromáticos del queroseno actúen como irritantes locales, causando el reclutamiento local de leucocitos y la expulsión de las secreciones glandulares (Lu & Morresey, 2006).

La literatura sobre el uso de infusiones intrauterinas con algunas sustancias arroja datos contradictorios. Un ejemplo es del plasma homólogo el cual, a pesar de su capacidad de potenciar las defensas in vitro, tiene un efecto inflamatorio local sobre el endometrio de la yegua cuando se compara con la solución salina (Waelchli et al. 1987). De la misma manera, el uso de químicos irritantes en el útero ha sido por mucho tiempo controversial. Una visión es que los antisépticos son demasiado irritantes para ser colocados en

el útero y que resultan en inflamación severa, ulceración y deposición de fibrina en el endometrio. Por otra parte, varios autores creen que el irritante puede ser benéfico o perjudicial, dependiendo de la dilución a la que se utilice (Threlfall, 1980). LeBlanc postula que el mayor problema con los componentes químicos utilizados en los lavados radica cuando son infundidos en concentraciones altas de manera que generan daños irreversibles a la yegua en la forma de adherencias uterinas y cervicales (LeBlanc, 2003).

La infusión intrauterina de antibióticos o antisépticos continúa siendo uno de los tratamientos de elección para la endometritis en la yegua, aunque existen reportes que demuestran que determinadas sustancias producen una reacción inflamatoria en el endometrio. La infusión de preparados con yodo da lugar a una reacción inflamatoria aguda en la capa epitelial superficial del endometrio que se caracteriza por una neutrofilia que dura hasta 10 días y continúa como una enfermedad crónica predominantemente a mononucleares hasta 30 días después (Olsen et al. 1992). Los resultados de Al-Bagdadi et al. (1987) describen que una infusión de iodopovidona al 1 % indujo un aumento de mastocitos en las muestras de biopsia analizadas, y los mismos parecían estar migrando hacia las glándulas endometriales. Por lo tanto, puede ser razonable suponer que la introducción intrauterina de determinadas soluciones antisépticas genera cambios patológicos en el útero que pueden provocar infertilidad en yeguas (Olsen et al. 1992).

HIPÓTESIS

Tal como se describió en la introducción, los aspectos moleculares y endocrinos del ambiente uterino son determinantes del éxito reproductivo. Sin embargo, se desconoce el efecto que ocasiona una infusión de iodopovidona sobre los niveles hormonales y/o la expresión de receptores esteroideos en el endometrio. Si los tratamientos intrauterinos provocaran una alteración de la expresión endometrial de los receptores esteroideos, tanto en forma directa (inflamación) como indirectamente (afectando los niveles de hormona en sangre), la fertilidad podría verse comprometida al determinar fallas del crecimiento embrionario y/o en el reconocimiento materno de la preñez. Por lo tanto, nos planteamos la hipótesis de que una infusión de iodopovidona al 1% induciría un proceso inflamatorio y una reducción de niveles de P4 en sangre, así como una respuesta inflamatoria en el endometrio que conduciría a una reducción en la expresión de receptores esteroideos a nivel endometrial.

OBJETIVOS

- I) Estudiar el efecto de una infusión intrauterina de iodopovidona al 1 % sobre los niveles sanguíneos de P4.
- II) Estudiar el efecto de una infusión intrauterina de iodopovidona al 1 % sobre las características histológicas endometriales.
- III) Estudiar el efecto de una infusión intrauterina de iodopovidona al 1 % sobre la expresión de los RE α y RP endometriales en dos momentos claves del ciclo: el día de entrada del embrión al útero (día 6 post ovulación) y el día esperado del comienzo de la luteólisis (día 15 post ovulación).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y tratamientos

El presente experimento se llevó a cabo durante los meses de diciembre del 2007, enero y febrero del 2008 en el campo Experimental nº 1 de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay, previa aprobación del proyecto por parte del comité de Bioética de la misma institución.

Se utilizaron 14 yeguas, cruce con raza Criolla, de entre 4 y 7 años, con un peso promedio de 400 kg y sin antecedentes de problemas de fertilidad. Se ratificó el estado sanitario de las mismas mediante examen físico y ultrasonografía (Omega Vission, Vission Scanners, E.I. Medical, Loveland, CO, USA), frotis uterino para citología e hisopados uterinos para cultivo.

Posteriormente se realizó sincronización de celo y ovulación de la siguiente manera: se dosificó con 250 µg de cloprostenol i.m. (Estrumate®, Schering-Plough, Essex Animal Health Friesoythe, Alemania), con repetición de dosis a los 14 días (Blanchard et al. 2003). Durante los siguientes días las yeguas fueron observadas junto a un padrillo para evidenciar eventual comportamiento de celo. Al cuarto día después de la 2º dosis, las yeguas fueron diariamente monitoreadas mediante ecografía transrectal para seguir el desarrollo folicular. Una vez que el folículo dominante alcanzó 35 mm, se dosificó con 2500 UI de hCG i.m. (Chorulon®, Intervet, Internacional, B.V., Holanda). Se continuó con el seguimiento ecográfico diario y se comprobó la desaparición del folículo dominante y éste fue considerado el día de la ovulación (día 0). Por otra parte durante el seguimiento ecográfico se monitorizó la eventual presencia de acúmulo de líquido intrauterino mayor a 2 cm.

Siete yeguas fueron asignadas al grupo tratamiento: se le realizaron infusiones intrauterinas en los días 0 y 2 post ovulación con 1000 ml de una solución de iodopovidona al 1%, de acuerdo al método descrito por Olsen et al. (1992).

Se extrajeron muestras de biopsia endometrial a todas las yeguas de acuerdo al método descrito por Kenney (1978), en el día 15 post ovulación. Se repitió la sincronización y en el siguiente ciclo se infundieron nuevamente las mismas 7 yeguas, extrayéndose muestras de biopsia a todas las yeguas en el día 6 post ovulación. Las biopsias fueron extraídas en diferentes ciclos debido al riesgo de ocasionar la lisis de cuerpo lúteo (Sharp, 1997). Por otra parte, en todas las yeguas en los dos días de extracción de biopsia, y previo a la misma, se realizaron exámenes ultrasonográficos para corroborar la presencia del CL.

Las muestras fueron conservadas en solución de paraformaldehído bufferado al 4%, hasta ser incluidas en parafina para ser sometidas a estudios posteriores.

Muestras de sangre

Se extrajeron muestras de sangre en los días 0, 2, 6, 9 y 15 post ovulación en cada uno de los 2 ciclos de estudio del ensayo. Fueron colectadas mediante venopunción yugular a través del sistema de vacutainer heparinizados y dentro de los 15 minutos posteriores centrifugadas (Rolco®, modelo 197, Industria Argentina) a 400 x g por 10 minutos. Se removió el suero y se almacenó en tubos identificados y por duplicado a -20 °C hasta la determinación hormonal.

Determinación hormonal

Las concentraciones de P4 fueron determinadas en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Uruguay. Se utilizó un radioinmunoensayo (RIA) en fase sólida, usando kits previamente validados para equinos (Donadeu y Ginther, 2002). La sensibilidad del test fue de 0,13 ng/ml. Los coeficientes de variación intra ensayo para los controles bajos (0,6 ng/ml), medios (1,4 ng/ml) y altos (5,7 ng/ml) fueron 7,6 %, 11,8 % y 6,1 %, respectivamente. Los coeficientes de variación inter ensayo fueron 12,7 % (0,75 ng/ml), 6,8 % (1,9 ng/ml) y 7,4 % (8,5 ng/ml).

Abundancia y localización tisular de receptores

Para la visualización de la inmunopositividad de los receptores se utilizó una técnica inmunohistoquímica (avidin-biotin-peroxidasa) previamente descrita (Meikle et al. 2000a). Se cortaron secciones de parafina (5 µm) y se colocaron en portaobjetos. Luego, los mismos se desparafinaron y rehidrataron en concentraciones decrecientes de etanol y se colocaron en buffer citrato (pH 6.0) en el microondas a máximo poder (700W) por 10 minutos para exponer el antígeno. La actividad endógena de la peroxidasa se bloqueó tratando los cortes con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3 % en metanol por 10 minutos a temperatura ambiente. Para disminuir las uniones no específicas, las secciones fueron sometidas a suero normal equino (Vectin S1000; Vector Laboratories, Burlingame, CA) en solución fosfato salina (PBS) por 30 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón para visualizar RE α y RP (RE α: C-311, cat# sc-787, Santa Cruz, California, USA; RP: Zymed cat # 18-0172, South San Francisco, CA; USA, respectivamente) a diferentes diluciones (RE α 1:25, RP 1:100). Los controles negativos fueron obtenidos al reemplazar el anticuerpo primario por suero no inmune a concentraciones similares. Luego de la incubación las secciones se incubaron entonces con anticuerpo biotinilado anti IgG de ratón (Vectastain, Vector Laboratories) diluido 1:200 en suero normal equino. Las secciones se incubaron con el complejo avidin-biotin-peroxidasa (Vectastain Elite; Vector Laboratories). El sitio de unión a la enzima se visualizó por la aplicación del sustrato 3,3'-diaminobenzidina en H₂O₂ (DAB kit; Vector Laboratories), un

cromógeno que produce un precipitado marrón insoluble al incubarse con la enzima. Los portaobjetos fueron teñidos con hematoxilina, luego deshidratados antes de ser montados con Pertex (Histolab, Gothenburg, Sweden). Todas las muestras se corrieron en el mismo ensayo inmunohistoquímico.

Análisis de imagen

La expresión endometrial de los receptores fue evaluada subjetivamente por dos observadores independientes, en compartimentos definidos por tipo celular (epitelio luminal, estroma y epitelio glandular) y ubicación (superficial y profundo). Fueron evaluados 10 campos por tipo celular a un aumento de 1000 en cada yegua. El inmunomarcado fue clasificado según la intensidad de la tinción en una escala de: (-) ausente, (+) leve, (++) moderado, (+++) intenso y la extensión de la tinción de cada tipo celular fue expresada en proporción de una escala de 0-10; el promedio de tinción fue expresado según $1 \times n1 + 2 \times n2 + 3 \times n3$, donde n = proporción de células por campo que exhiben tinción leve (1), moderada (2) e intensa (3) (Boos et al. 1996). La proporción estimada del total de células positivas por campo fue registrada.

Análisis histológico

Las muestras sometidas a paraformaldehído fueron acondicionadas hasta ser incluidas en parafina. Se cortaron secciones de 5 μ m y fueron teñidas con hematoxilina–eosina y posteriormente evaluadas y clasificadas histológicamente de acuerdo al criterio de Kenney y Doig (1986).

Análisis estadístico

Las variables estudiadas en el análisis de la localización de receptores mediante inmunohistoquímica fue el área positiva (referida en porcentaje de células positivas) y la intensidad promedio de los 10 campos. Fueron sometidas a análisis de varianza utilizando un modelo mixto (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) que incluyó los efectos del observador, día, tratamiento, tipo celular (epitelio luminal, glandular y estroma), localización (superficial y profundo) y sus interacciones. Las concentraciones plasmáticas de P4 fueron analizadas mediante el mismo modelo mixto, que incluyó las variables día, tratamiento y sus interacciones. El nivel de significación considerado fue $P < 0,05$ y los valores de P comprendidos entre 0,05 y 0,1 se consideraron como tendencia.

RESULTADOS

Los resultados del análisis de varianza de las concentraciones plasmáticas de P4 y la localización de receptores mediante inmunohistoquímica pueden observarse en la tabla I.

Tabla I. Nivel de significancia de los efectos fijos e interacciones estudiadas en el modelo estadístico. Los efectos fijos para la hormona progesterona (P4) son tratamiento (trat.: con o sin infusión intrauterina de iodopovidona), día del ciclo (día: 0, 2, 6, 9, y 15 post ovulación) y su interacción. Para el caso de receptores de estrógeno (RE α) y progesterona (RP) son tratamiento, día del ciclo (6 y 15), observador (evaluador de tinción), tipo celular (tipo cel: epitelio luminal, estroma, epitelio glandular), ubicación (ub.: superficial o profunda) y sus interacciones. Positividad de tinción (PosT); intensidad de tinción (IT).

Variable	trat.	día	trat. x día	observador	tipo cel.	ub.	trat. x día x ub. x tipo cel.
P4	NS	***	**				
RE α							
PosT	NS	*	NS	NS	***	**	NS
IT	NS	*	NS	NS	***	**	NS
RP							
PosT	*	NS	NS	0.1	***	***	***
IT	NS	NS	NS	*	***	***	***

NS=no significativo; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Análisis histológico

Como se observa en la figura 5, no se observaron signos de endometritis en ninguna de las muestras evaluadas, encontrándose todas en la categoría I de la clasificación de Kenney y Doig. Se evidenciaron células inflamatorias en algunas muestras (Fig. 5, b). Las yeguas presentaron un endometrio cíclico, activo y con una apariencia histológica correspondiente al momento del ciclo en que fueron extraídas las muestras.

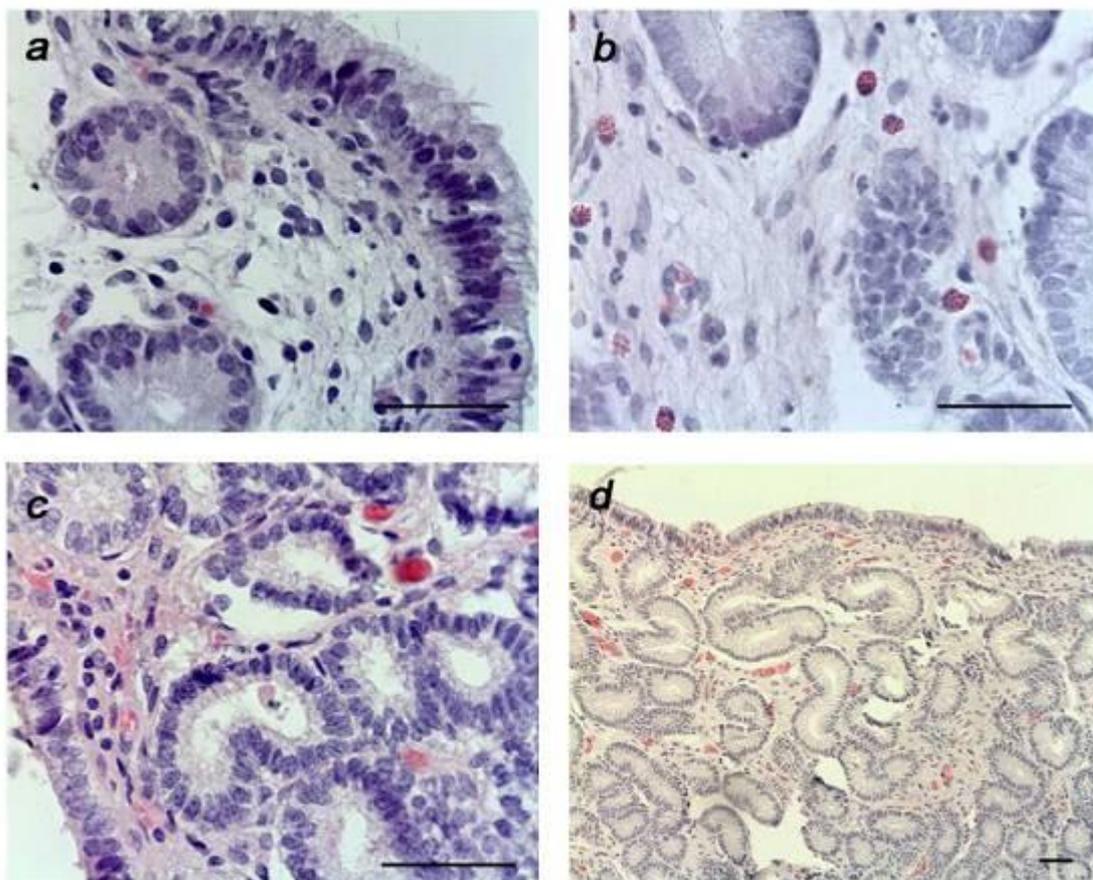


Figura 5. Fotografías de muestras de biopsias endometriales de yeguas pertenecientes al grupo control en el día 6 (a) y día 15 (c) y de yeguas infundidas en el día 6 (b) y 15 (d) post ovulación. (tinción H&E) (aumento 100x y 400x). Barra de escala = 100 μ m.

Niveles de P4

La figura 6 muestra que los niveles de P4 alcanzaron un máximo en el diestro temprano (día 6 post ovulación), observándose concentraciones más bajas el día 9 post ovulación que continuaron declinando en el diestro tardío. Los niveles de P4 estuvieron afectados por la interacción tratamiento x día ($P < 0.01$, Tabla I). Las yeguas tratadas tuvieron niveles de P4 más bajos el día 2 post ovulación (3.9 ng/ml vs. 6.6 ng/ml, $P=0.07$), y niveles más altos el día 15 post ovulación comparadas con las controles (4.4 ng/ml vs. 1.3 ng/ml, $P=0.07$).

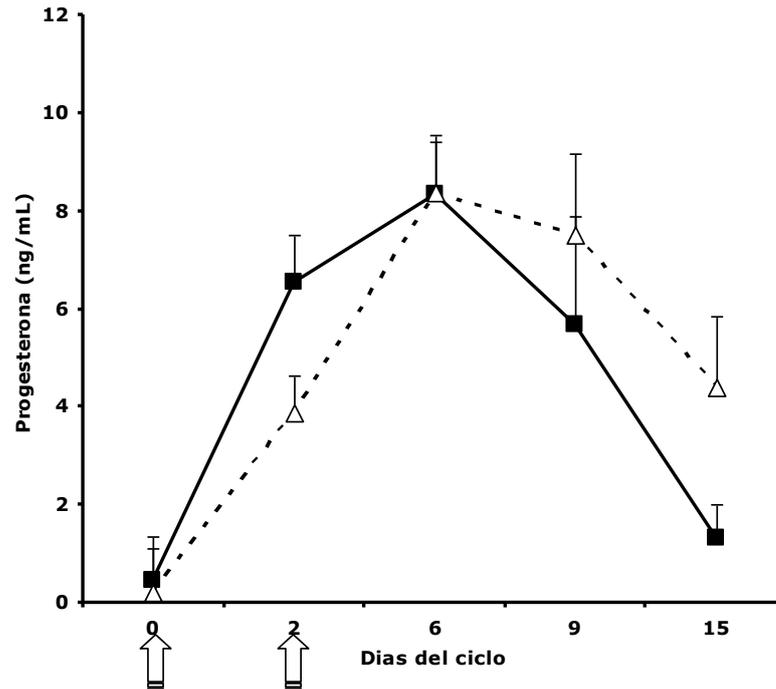


Figura 6. Concentraciones de P4 en yeguas control (—■—) e infundidas (--△--) durante los días 0, 2, 6, 9 y 15 post ovulación. Las muestras de ambos ciclos estudiados fueron agrupadas. Las flechas indican los días de infusión en el grupo tratado.

Receptores

De las muestras de biopsia extraídas de las 14 yeguas en los dos ciclos, finalmente pudieron evaluarse menos muestras (RE α : grupo control: 3 del día 6 y 3 del día 15; grupo infundido: 5 del día 6 y 6 del día 15. PR: grupo control: 4 del día 6 y 4 del día 15; grupo infundido: 6 del día 6 y 7 del día 15).

Aspectos Generales

La inmunoreactividad de RE α y RP fue detectada exclusivamente en el núcleo celular de todos los tipos celulares estudiados. Cuando los anticuerpos específicos monoclonales fueron sustituidos por IgG no inmune de ratón, la ausencia de tinción confirmó la alta especificidad de inmunotinción para ambos receptores (Fig. 7). En la figura 9 se muestran los detalles de los cambios de tinción para los diferentes días y tratamientos.

RE α

Los contenidos celulares de RE α fueron leves a moderados, observándose una mayor tinción al día 15 post ovulación comparado con el día 6 ($P < 0.05$) en todos los tipos celulares, excepto en el epitelio glandular profundo. En

este tipo celular existió un mayor inmunomarcado al día 6 ($P=0.08$) comparado con el día 15 post ovulación en el grupo control, reducción que no fue observada en el grupo infundido (Figura 9, e). La infusión de iodopovidona no afectó la expresión de éste receptor (Tabla I).

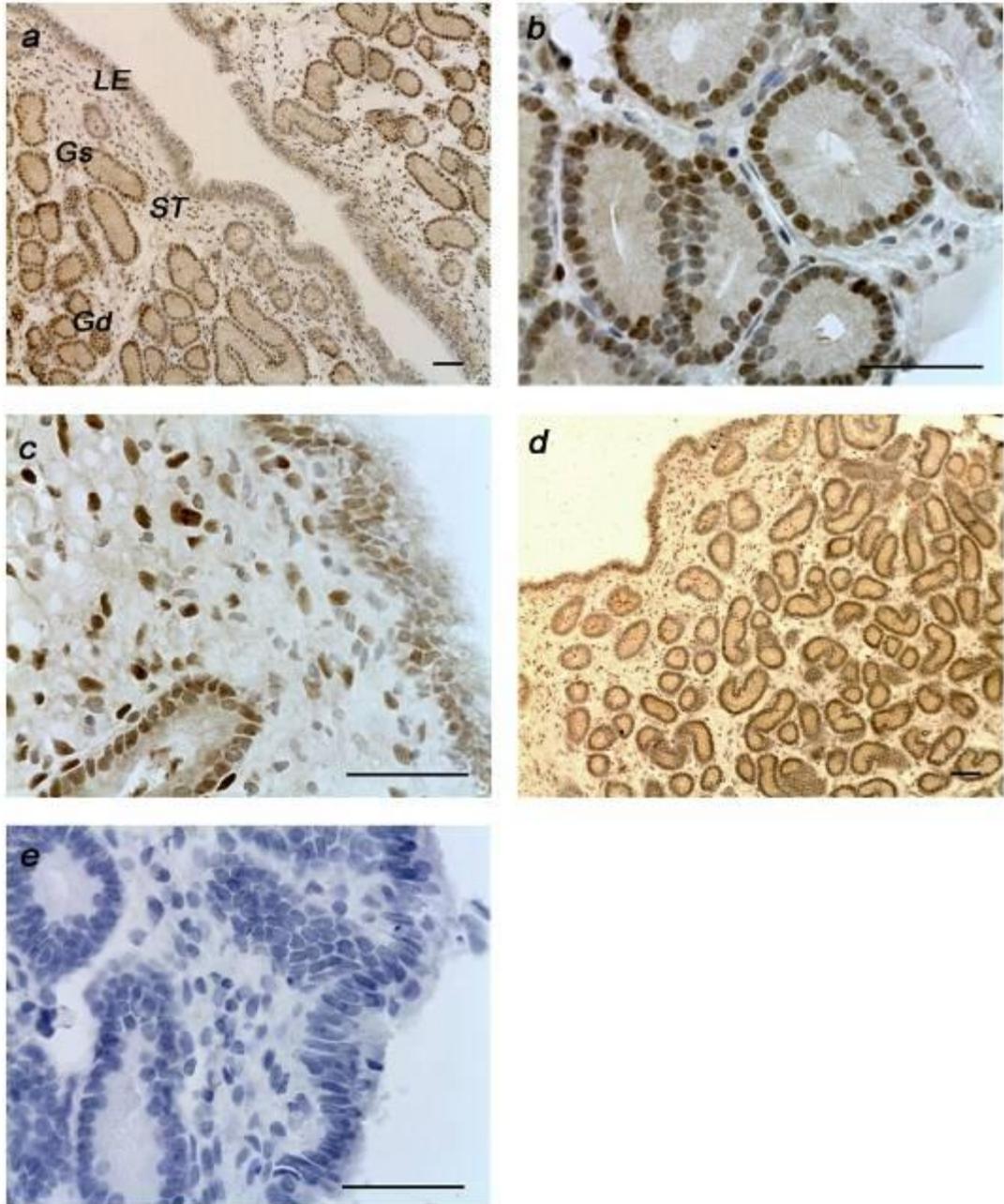


Figura 7. Inmunomarcado de RE α al día 6 post ovulación de yeguas pertenecientes al grupo control (a) y yeguas infundidas (b) y al día 15 post ovulación en yeguas control (c) e infundidas (d) (aumento 100 x y 400 x) Barra de escala = 100 μ m. LE = epitelio luminal, Gs = epitelio glandular superficial, Gd = epitelio glandular profundo, ST = estroma. Cuando se sustituyeron los anticuerpos específicos, la ausencia de inmunomarcado confirmó la especificidad de la tinción (e=negativo).

RP

La expresión del RP fue diferente en los tres tipos celulares (Figura 9), presentando mayores niveles de tinción general que RE α . Se observó una mayor inmunoreactividad al d 6 comparando con el día 15 post ovulación en el epitelio luminal (PosT $P < 0.001$; Figura 9 b; IT $P < 0.01$) y glandular superficial ($P = 0.08$), con una situación inversa en el glandular profundo y estroma superficial y profundo ($P < 0.01$). Una reducción en la tinción del receptor se evidenció al día 6 post ovulación al comparar los grupos control e infundido (Fig. 8), disminuyendo significativamente en el epitelio glandular profundo en el grupo tratado ($P < 0.05$) (Fig. 9).

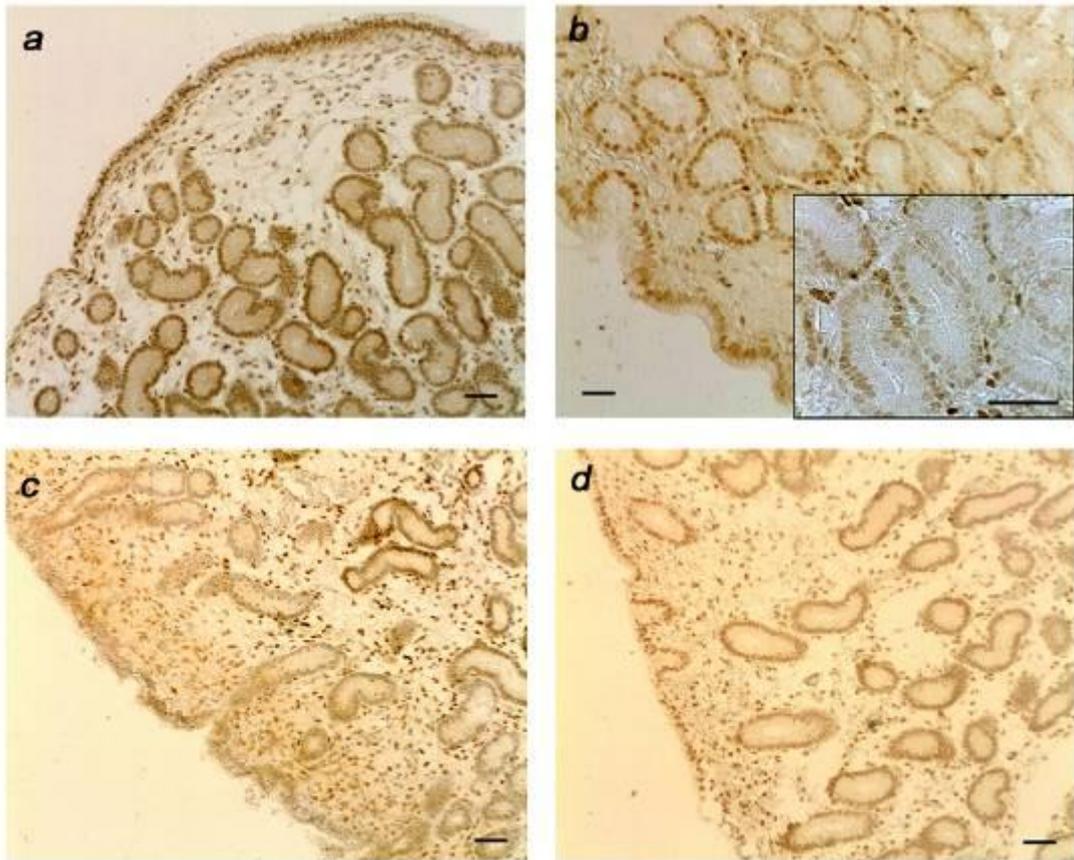


Figura 8. Inmunomarcado de RP al día 6 post ovulación de yeguas pertenecientes al grupo control (a) y yeguas infundidas (b) y al día 15 post ovulación en yeguas control (c) e infundidas (d) (aumento 100 x y 400 x) Barra de escala = 100 μ m.

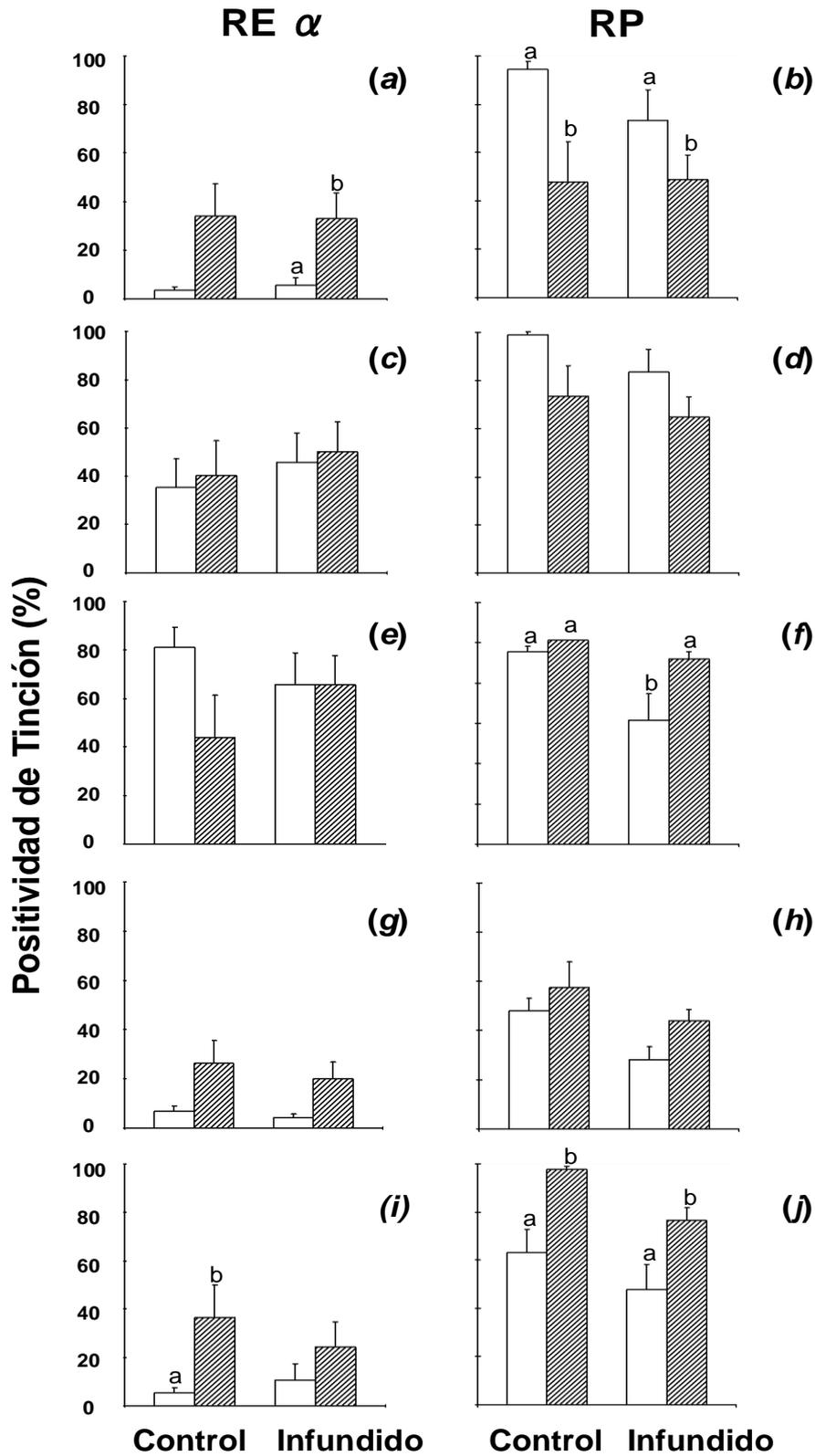


Figura 9: Porcentaje de células positivas al inmunomarcado de receptores de estrógeno (RE α ; panel izquierdo) y progesterona (RP; panel derecho) en los grupos control e infundido, en los días 6 (□) y 15 (▨) post ovulación. (a,b) epitelio luminal, (c,d) epitelio glandular superficial, (e,f) epitelio glandular profundo, (g,h) estroma superficial, (i, j) estroma profundo. Los datos corresponden a las medias de mínimos cuadrados \pm ES. Las barras de error con diferentes superíndices en la misma gráfica difieren: a,b P < 0.05.

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que reporta los efectos de la infusión intrauterina de una solución con iodopovidona en los niveles de P4 y receptores esteroideos en el endometrio equino. La hipótesis de que una infusión de iodopovidona al 1% induciría una respuesta inflamatoria en el endometrio, fue rechazada. Sin embargo, el tratamiento redujo la expresión de RP y los niveles de P4 durante las etapas luteales tempranas.

Para comprender la regulación de la función endometrial por las hormonas esteroideas se requiere del examen de los patrones de expresión específicos de cada tipo celular (Hartt et al. 2005) y la metodología utilizada permitió evidenciarlo. En el presente trabajo la inmunoreactividad de ambos receptores varió significativamente (Tabla I) en casi todas las variables estudiadas, es decir, de acuerdo al día, tipo y ubicación celular, confirmando que los diversos tipos celulares responden en forma diferente al mismo estímulo hormonal, coordinándose para permitir diferentes eventos fisiológicos (luteólisis, implantación), tal como fue descrito en ovejas (Meikle, 2001; Sosa et al. 2006) y yeguas (Watson et al. 1992; Aupperle et al. 2000; Hartt et al. 2005).

La expresión de RE α y RP, medida en IT y PosT, que encontramos en las yeguas control de nuestro experimento coincide mayoritariamente con el patrón descrito para la especie (Aupperle et al. 2000). Los autores describen que en el epitelio luminal, los niveles de RE α , fueron casi indetectables al día 6 post ovulación, con un aumento al día 15, mientras que la situación es opuesta para el RP (altos niveles al día 6 post ovulación con una disminución al día 15). El epitelio glandular fue el tipo celular con mayor tinción al día 6 post ovulación, observándose un comportamiento similar de ambos receptores. El patrón que encontramos para RE α y RP en el epitelio glandular coincide con el descrito por Aupperle et al. (2000) excepto para la tinción del RP en glandular profundo, donde observamos tinciones similares entre el día 6 y 15 post ovulación, mientras los anteriores autores una disminución al día 15. Quizás nuestros resultados se acercan al concepto propuesto por Brunkhorst et al. (1991), quienes encuentran que los cambios en glandular profundo siguen los del epitelio y glandular superficial, aunque aplazados 3 días. De todas formas no podemos concluir esto sin contar con muestras de biopsia más allá del día 15 post ovulación.

Nuestras observaciones en el estroma coinciden con los hallazgos de Watson et al. (1992), Aupperle et al. (2000) y Hartt et al. (2005) quienes observaron un aumento de los niveles de RE α y RP hacia el día 15 post ovulación, aunque los niveles detectados por los anteriores autores para el RP al día 6 fueron un poco menores que los hallados en nuestro experimento.

Además de una variación temporal y espacial, existieron variaciones por los efectos de la infusión intrauterina en el RP, y así lo evidencia el efecto significativo de la cuádruple interacción tratamiento x día x ubicación x tipo celular en la IT y la PosT (Tabla I). La observación más importante fue que este tratamiento en los días 0 y 2 post ovulación provocó una disminución en

la PostT del RP. La disminución del RP fue observada en nuestro ensayo en todos los compartimentos endometriales al día 6 post ovulación (Fig. 9), pero significativamente en el epitelio glandular profundo al día 6, es decir, el día que correspondería a la llegada del embrión al útero. Este hallazgo cobra especial importancia si tenemos en cuenta que cualquier cambio en la habilidad de las glándulas endometriales en responder a la P4 influenciará la sensibilidad y funcionalidad del tejido (Sosa et al, 2006). Las acciones de la P4, mediadas a través del RP, son críticas en la preparación del endometrio para la preñez (Couse, 2006). El aumento postovulación de la P4 logra estimular la proliferación epitelial luminal y glandular en la yegua además de la formación de glándulas funcionales en el endometrio. Niveles máximos de P4 al día 5 post ovulación están asociados con niveles máximos de receptores y proliferación en células epiteliales (Aupperle et al. 2000).

No hubo efecto del tratamiento en la IT del RP, y aunque no tenemos una explicación para este resultado, el mismo nos revela la complejidad de los mecanismos involucrados en la señalización de los receptores así como en la capacidad de la propia célula de regular su sensibilidad a la acción hormonal (Meikle 2010, com. personal).

Por otra parte, no existió influencia del efecto tratamiento al día 15 post ovulación, lo que podría indicar cierta capacidad de recuperación del endometrio a la injuria producida al comienzo del ciclo. De todas formas, aunque no existan efectos al día 15, una menor sensibilidad a los esteroides ováricos en el diestro temprano, podría traducirse en un inadecuado sustento de las necesidades de un embrión en crecimiento, en un retraso en su desarrollo y/o en muerte embrionaria más allá de ese período (Sosa et al. 2006), aun teniendo en cuenta que la disminución de los RP en el diestro tardío (día 11-13 post ovulación) es un pre-requisito para la implantación en mamíferos (Bazer et al. 2009). La alteración de la expresión génica uterina durante la primera semana de gestación podría ser suficiente para determinar el fracaso de una nueva gestación (Sosa et al. 2006). A partir del día 6 post ovulación, el sustento del concepto equino es el histotrofo, que incluye principalmente a la p19, proteína P4-dependiente cuyo mRNA está localizado en el epitelio luminal y glandular en la yegua (Crosset et al. 1996).

El tratamiento no afectó al RE α , aunque, es necesario advertir que los resultados para éste receptor en el grupo control son limitados debido al bajo número de muestras que pudieron ser procesadas para el mismo. Sin embargo, cabe mencionar que existen reportes en humanos que concluyen que ciertos tóxicos afectan selectivamente los RP (Bruner-Tran et al. 2008).

A pesar de que se observó un efecto en RP, no existieron alteraciones histológicas indicativas de endometritis en ningunas de las muestras evaluadas. Nuestros resultados difieren de aquellos que describen grandes infiltraciones de células de defensa, necrosis, edema, fibrosis crónicas irreversibles, hasta 30 días después de realizado el tratamiento con iodopovidona (Brinsko et al. 1990; Olsen et al. 1992). Aunque pudieron evidenciarse células inflamatorias en algunas muestras (Fig. 5, b), esto corresponde a la leve y difusa reacción generada por la biopsia endometrial. (Olsen et al. 1992). En casos de endometritis localizadas, una sola muestra de biopsia endometrial podría no ser suficiente para detectar la afección. En

este trabajo se infundió un mayor volumen de solución que el descrito por Olsen et al. (1992), teniendo en cuenta lo anterior y buscando llegar a toda la superficie endometrial, pero la inducción no generó signos histológicos de endometritis, al menos no al día 6 post ovulación. Cabe destacar que no se conoció el status anterior a ese día de extracción y que el día del muestreo podría haber sido tarde para detectar los cambios. Fumuso et al. (2007) reportan que, en yeguas sanas, un estímulo inflamatorio durante el estro, que generó un aumento de células inmunes, se resolvió al día 7 post ovulación. Una situación similar podría haber ocurrido en nuestros animales. Otra explicación puede ser que la aparición de efectos adversos depende de la sensibilidad de la yegua (Dascanio et al. 2001), y en este ensayo se utilizaron yeguas jóvenes, cruza con raza criolla (y no de una raza susceptible, como la Pura Sangre de Carrera) y sin antecedentes de problemas reproductivos. De todas formas, nuestros resultados coinciden con los de Brinsko et al. (1990), quienes concluyen que una infusión de iodopovidona al 0.05 % al día 0 (ovulación) no genera cambios a nivel de células inflamatorias al día 6. Estudiar y comparar los efectos histológicos y moleculares de diferentes concentraciones de iodopovidona, podría aportar información valiosa al momento de decidir la opción terapéutica en la práctica equina.

Los perfiles de P4 observados en el grupo control en este experimento coinciden con los descritos por Nagy et al. (2004) para la especie equina. La evolución de los niveles de P4, también estuvo afectada por la infusión de iodopovidona (Tabla I), resultando en un menor nivel dos días luego de la ovulación (Fig. 6). Esta disminución podría explicarse por una liberación transitoria de PG desencadenada por la infusión intrauterina o por una disminución en el pH (Lu & Morresey, 2006) pero que no induciría la luteólisis, ya que el CL es refractario a su acción hasta el día 5 post ovulación (Ginther, 1992). Troedsson et al. (2001) concluyeron que inyecciones repetidas de un análogo de PG dentro de las primeras 48 horas post ovulación afectaron la función luteal de forma reversible y temporalmente. Los animales tratados presentaban menores niveles de P4 desde el día 2 hasta el día 5 post ovulación, pero al día 8 los niveles hormonales se igualaron con los del grupo control. Sin embargo, la disminución entre los días 2 y 5 fue suficiente para disminuir las tasas de preñez al día 14 de las yeguas tratadas (12.5%) en comparación con los controles (62,5 %). Los autores sugieren que las dosificaciones de PG interferirían con la formación del CL y causarían que se desarrolle más lentamente; las bajas tasas de preñez obtenidas en dicho ensayo claramente demuestran la importancia de un CL funcional desde el mismo día de la ovulación, aunque los niveles de P4 se recuperen posteriormente. Para el caso del presente proyecto, una mayor frecuencia de extracciones sanguíneas para medir P4 podría haber mejorado la interpretación de los nuestros datos, aunque es probable que una situación similar, en relación al desarrollo del CL, haya ocurrido.

Aunque existió un efecto significativo día x tratamiento (Tabla I), no hubo diferencias en los niveles plasmáticos de P4 al día 6 post ovulación (Fig. 6), cuando sí disminuyeron los niveles de RP en el endometrio. Por otra parte, en lo que respecta al RE α , no existió un efecto tratamiento, siendo que la

P4 también regula este receptor. Todo esto sugiere que la P4 circulante no representa el factor responsable de la menor expresión del RP. Tal como se describió en la revisión, actualmente se conocen varios mecanismos de señalización alternativos para los receptores esteroideos que difieren del modelo clásico, como la interacción del receptor con sistemas intracelulares y segundos mensajeros en ausencia de ligandos esteroideos afines (Couse et al. 2006). Muchos estudios en humanos intentan dilucidar los mecanismos locales que podrían disminuir la acción de la P4 en el miometrio o a nivel de la decidua y las membranas fetales previo al parto, y que actúan a pesar del mantenimiento de altos niveles circulantes de P4. Los diferentes autores concluyen que la PG actúa a través de la vía proteína quinasa C reduciendo los niveles de RP (Goldman et al. 2005). A pesar de todo, no se puede asumir, basado en nuestros resultados, que la povidona iodada, la PG o algún factor presente en las yeguas infundidas actuó mediante éstos mecanismos, y por tanto es necesario investigar más acerca de ésta hipótesis.

CONCLUSIONES

La infusión intrauterina de iodopovidona al 1 % aplicada durante los días 0 y 2 post ovulación en yeguas sanas:

- a) Afecta los perfiles de P4 sanguínea. Reduce las concentraciones de hormonales al día 2 y las aumenta al día 15 post ovulación.
- b) No induce cambios histológicos indicativos de endometritis al día 6 o 15 post ovulación.
- b) No afecta la expresión del RE α al día 6 o 15 post ovulación, pero disminuye la PosT del RP a nivel glandular profundo al día 6.

CONSIDERACIONES FINALES

Varios aspectos de la preñez en equinos parecen ser exclusivos del género *Equus* y son de considerable interés académico y relevancia práctica. Desde el momento de la fecundación del ovocito poco después de la ovulación hasta el establecimiento de una placenta madura y funcional, unos 150 días más tarde, tienen lugar una serie de cambios morfológicos, inmunológicos y endocrinológicos en el oviducto y el útero. Estos cambios son importantes para el establecimiento y mantenimiento de la preñez, y difieren notablemente de los eventos equivalentes en las demás especies animales domésticas (Allen, 2000). Por otra parte, la yegua presenta la menor eficiencia reproductiva de los animales domésticos. A pesar de todo lo anterior, es la especie menos estudiada. Los antecedentes de trabajos vinculados a los aspectos moleculares endometriales en equinos son escasos y algunos presentan aspectos cuestionables en sus protocolos, como la utilización de animales de razas y edades muy diversas o con un historial o status reproductivo desconocido. La EPPS continúa siendo una frecuente amenaza para los sistemas de cría equinos y un objetivo constante de investigación. Los reportes acerca de los tratamientos intrauterinos con diferentes soluciones de antisépticos, a diferentes concentraciones, se han enfocado mayormente a describir las consecuencias de los tratamientos en la estructura histológica endometrial o directamente en las tasas de concepción, pero hasta el momento no hemos encontrado en la literatura referencias de sus efectos en los aspectos moleculares endometriales y/o endócrinos. Por lo tanto entendemos que la información generada puede aportar datos valiosos y orientativos para la elección tanto del tratamiento como del método diagnóstico de yeguas de cría, teniendo en cuenta que una manifestación molecular endometrial (disminución de RP) no fue acompañada por signos histopatológicos en la biopsia endometrial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al-Bagdadi F, Richardson B, Eilts L, Olsen D, McCoy W, Braun L, Archbald D, Thompson, Tittkemeyer C. (1987). Observations on the ultrastructure of uterine glands of mares infused with povidone iodine solution. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 16(1): 73 - 92.
2. Allen W. (2000). The physiology of early pregnancy in the mare. 46th AAEP Annual Convention, 26-29, November, San Antonio, Texas, USA. pp: 338-354.
3. Aupperle H, Ozgen S, Schoon HA, Schoon D, Hoppen HO, Sieme H, Tannapfel A. (2000). Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. *Equine Veterinary Journal* 32: 228-232.
4. Bae SE, Watson ED. (2003). A light microscopic and ultrastructural study on the presence and location of oxytocin in the equine endometrium. *Theriogenology* 60: 909-921.
5. Ball BA, Shin SJ, Patten WH, Lein DH, Woods GL. (1988). Use of a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium. *Theriogenology* 29: 1269-1283.
6. Ball BA. (1993). Embryonic death in mares. En: McKinnon AO, Voss JL. (1993) *Equine Reproduction*. Ed. McKinnon AO, Voss JL. 2nd ed. Lea and Febiger. Philadelphia, Cap. 61, pp.517-531.
7. Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Wu G. (2009). Comparative aspects of implantation. *Reproduction* 138(2): 195-209.
8. Behrendt-Adam CY, Adams MH, Simpson KS, McDowell KJ. (1999). Oxytocin-neurophysin I mRNA abundance in equine uterine endometrium. *Domestic Animal Endocrinology* 16(3): 183-192.
9. Blanchard TL, Warner DD, Schumacher J, Love CC, Brinsko SP, Rigby SL. (2003). *Manual of equine reproduction*. Ed. Fathman EM. Mosby. 2nd ed. St. Louis.
10. Boerboom D, Brown KA, Vaillancourt D, Poitras P, Goff AK, Watanabe K, Doré M, Sirois J. (2004). Expression of key prostaglandin synthases in equine endometrium during late diestrus and early pregnancy. *Biology of Reproduction* 70: 391-399.
11. Boos A, Meyer W, Schwarz R, Grunert E. (1996). Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Animal Reproduction Science* 44: 11-21.

- 12.Bracher V, Mathias S, Sheldrick L. (1991).Oestrogen and progesterone receptor concentration in the endometrium of normal and subfertile mares. *Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series* 7: 73.
- 13.Brinsko SP, Varner DD, Blanchard TL. (1990).The effect of postbreeding uterine lavage on pregnancy rate in mares. *Theriogenology* 33: 465-475.
- 14.Brinsko SP. (2001).How to perform uterine lavage: Indications and practical techniques. 47th AAEP Annual Convention, 24-28, November, San Diego, California, USA. pp: 407-411.
- 15.Bruner-Tran KL, Yeaman GR, Crispens MA, Igarashi TM, Osteen KG. (2008).Dioxine may promote inflammation-related development of endometriosis. *Fertility and Sterility* 89(5): 1287-1298.
- 16.Brunckhorst D, Schoon HA, Bader H, Sieme H. (1991).Morphologische, enzym- und immunhistochemische charakteristika des endometrialen zyklus bei der stute. *Fertilität* 7: 44-51.
- 17.Causey RC. (2006).Making sense of equine uterine infections: The many faces of physical clearance. *The Veterinary Journal* 172: 405-421.
- 18.Cochet M, Vaiman D, Lefèvre F. (2009).Novel interferon delta genes in mammals: cloning of one gene from the sheep, two genes expressed by the horse conceptus and discovery of related sequences in several taxa by genomic database screening. *Gene* 15; 433(1-2): 88-99.
- 19.Concha-Bermejillo A, Kennedy PC. (1982).Prognostic value of endometrial biopsy in the mare: A retrospective analysis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 181(7): 680-681.
- 20.Couse JF, Hewitt SC, Korach KS. (2006).Steroid receptors in the ovary and uterus. En: Neill JD. (2006) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Ed. Neill JD. Elsevier. 3rd ed. New York. Cap. 15, pp. 593-678
- 21.Crossett B, Allen WR, Stewart F. (1996).A 19 kDa protein secreted by the endometrium of the mare is a novel member of the lipocalin family. *Biochemical Journal* 15: 137-143.
- 22.Dascanio JJ, Schweizer C, Ley WB. (2001).Equine fungal endometritis. *Equine Veterinary Education* 13(6): 324-329.
- 23.Doig PA, McKnight JD, Miller RB. (1981).The use of endometrial biopsy in the infertile mare. *Canadian Veterinary Journal* 22: 72-76.
- 24.Donadeu F, Ginther OJ (2002).Changes in concentrations of follicular fluid factors during follicle selection in mares. *Biology of Reproduction* 66: 1111-1118.
- 25.Ealy AD, Eroh ML, Sharp DC. (2010).Prostaglandin H synthase Type 2 is differentially expressed in endometrium based on pregnancy status in

- pony mares and responds to oxytocin and conceptus secretions in explant culture. *Animal Reproduction Science* 117(1-2): 99-105.
26. Eisele A, Desvovsge AL, Sharp DC. (2002). Evaluation of equine endometrial prostaglandin synthesis inhibitor (EPSI) activity with a commercially-available COX-2 inhibitor screening assay. *Theriogenology* 58: 809-811.
 27. Fumuso EA, Aguilar J, Giguere S, Rivulgo M, Wade J, Rogan D. (2007). Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: Effects of immunomodulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 118: 30-39.
 28. Gigli I, Russo A, Agüero A. (2006). Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *Investigación Veterinaria* 8(1): 183-204.
 29. Ginther OJ. (1992). Reproductive biology of the mare. Basic and applied aspects. Ed. Ginther OJ. Equiservices. 2nd ed. Winsconsin.
 30. Ginther OJ. (2009). A 40-year odyssey into the mysteries of equine luteolysis. *Theriogenology* 72: 591–598.
 31. Goldman S, Weiss A, Almalah I, Shalev E. (2005). Progesterone receptor expression in human decidua and fetal membranes before and after contractions: possible mechanism for functional progesterone withdrawal. *Molecular Human Reproduction* 11: 269-277.
 32. Gutjahr S, Paccamonti DL, Pycock JF, Taverne MA, Dieleman SJ, van der Weijden GC. (2000). Effect of dose and day of treatment on uterine response to oxytocin in mares. *Theriogenology* 54: 447-456.
 33. Hartt LS, Carling SJ, Joyce MM, Johnson GA, Vanderwall DK, Ott TL. (2005). Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. *Reproduction* 130: 241-250.
 34. Keller A, Pires Neves A, Aupperle H., Steiger K, Schoon HA, Klug E, Gregory RM, Mattos R. (2004). Exame histopatológico do endométrio da égua após infecções experimentais repetidas e cinco diferentes tratamentos: aspectos inflamatórios. *Acta Scientiae Veterinariae* 32(3): 215-223.
 35. Kenney RM (1978). Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy with a note on early embryonic death. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 17(23): 241-262.
 36. Kenney RM, Doig PA. (1986). Equine endometrial biopsy. En: Morrow DA. (1986) Current therapy in theriogenology. Ed. Morrow DA. Saunders. 2nd ed. Philadelphia, Cap.8, pp.723-729.

37. Klein C, Scoggin KE, Ealy AD, Troedsson MH. (2010). Transcriptional profiling of equine endometrium during the time of maternal recognition of pregnancy. *Biology of Reproduction*. in press. <http://www.biolreprod.org/content/early/2010/03/24/biolreprod.109.081612.full.pdf+html>.
último acceso: 25/04/10.
38. Knutti B, Pycock JF, Van Der Weijden GC, Küpffer U. (2000). The influence of early postbreeding uterine lavage on pregnancy rate in mares with intrauterine fluid accumulations after breeding. *Equine Veterinary Education* 12(5): 267-270.
39. LeBlanc MM. (1998). Enfermedades del aparato reproductivo: La yegua. En: Colahan PT, Mayhew IG, Merritt AM, Moore JN. (1998) *Medicina y cirugía equina*. Ed. Pratt PW. 4ª ed. Intermédica. Buenos Aires, Cap 10, pp. 869-989.
40. LeBlanc MM. (2003). Persistent mating induced endometritis in the mare: Pathogenesis, diagnosis and treatment. http://www.ivis.org/advances/Reproduction_Ball/leblanc/ivis.pdf. último acceso: 27/05/10.
41. LeBlanc MM, Magsig J, Stromberg AJ. (2007). Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology* 68: 403-12.
42. LeBlanc MM, Causey RC. (2009). Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility. *Reproduction in Domestic Animals* 44(3): 10-22.
43. Liu IKM, Troedsson MHT. (2008). The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today. *Theriogenology* 70: 415-420.
44. Lu KG, Morresey PR. (2006). Reproductive tract infections in horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 22: 519-552.
45. Maischberger E, Irwin JA, Carrington SD, Duggan VE. (2008). Equine post-breeding endometritis: A review. *Irish Veterinary Journal* 61(3): 163-168.
46. Malschitzky E, Jobim IM, Gregory RM, Mattos R. (2007). Endometrite na égua, novos conceitos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 31(1): 17-26.
47. McDowell KJ, Adam CY, Simpson KS. (1999). Changes in equine endometrial oestrogen receptor α and progesterone receptor mRNA during oestrus cycle, early pregnancy and after treatment with exogenous steroids. *Journal of Reproduction and Fertility* 117: 135-142.
48. McMeen LS. (2002). Follicular growth and development and gonadotropin response of mares treated with dihydrotestosterone and estradiol benzoate. Tesis de Maestría, Faculty of the Louisiana State University, Louisiana, USA.

49. Meikle A, Bielli A, Masironi B, Pedrana G, Wang H, Forsberg M, Sahlin L. (2000a). An immunohistochemical study on the regulation of estrogen receptor alpha by estradiol in the endometrium of the immature ewe. *Reproduction Nutrition Development* 40: 587-596.
50. Meikle A, Forsberg M, Sahlin L, Masironi B, Tasende C, Rodriguez-Pinon M, Garofalo EG. (2000b). A biphasic action of estradiol on estrogen and progesterone receptor expression in the lamb uterus. *Reproduction Nutrition Development* 40: 283-293.
51. Meikle A (2001). *Endocrinology of prepubertal and anestrous ewes*. Tesis doctoral, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suecia.
52. Morris LH, Allen WR. (2002). Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. *Equine Veterinary Journal* 34(1): 51-60.
53. Nagy P, Huszenicza G, Reiczigel J, Juhasz J, Kulcsar M, Abavary K, Guillaume D. (2004). Factors affecting plasma progesterone concentration and the retrospective determination of time of ovulation in cyclic mares. *Theriogenology* 61: 203-214.
54. Neely DP, Hughes JP, Stabenfeldt GH, Evans JW. (1975). The influence of intrauterine saline infusion on luteal function and cyclical activity in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility* 23(Suppl): 235-239.
55. Nielsen JM. (2005). Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology* 64: 510-518.
56. Olsen LM, Al-Bagdadi FK, Richardson CF, Archbald LF, Braun WF, McCoy DJ, Godke RA, Titkemeyer CW, Thompson DL. (1992). A histological study of the effect of saline and povidone iodine infusions on the equine endometrium. *Theriogenology* 37(6): 1311-1325.
57. Pascoe DR, Stabenfeldt GH, Hughes JP, Kindahl H. (1989). Endogenous prostaglandin F2 alpha release induced by physiologic saline solution infusion in utero in the mare: effect of temperature, osmolarity, and pH. *American Journal of Veterinary Research* 50(7): 1080-1083.
58. Raila G, Aupperle H, Schoon HA, Menger S, Schoon D, Mülling C, Sieme H, Klug E. (1998). Endometrosis in the mare: immunohistological and ultrastructural investigations. *Reproduction in Domestic Animals (Suppl.)* 5: 115.
59. Rambags BP, van Rossem AW, Blok EE, de Graaf-Roelfsema E, Kindahl H, van der Kolk JH, Stout TA. (2008). Effects of exogenous insulin on luteolysis and reproductive cyclicity in the mare. *Reproduction in Domestic Animals* 43(4): 422-428.
60. Reilas T (2001). *Uterine luminal environment of the mare*. Academic Dissertation: 23, November, Veterinary Medicine Faculty, University of Helsinki, Finlandia.

61. Satterfield MC, Bazer FW, Spencer TE. (2006). Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. *Biology of Reproduction* 75: 289-296.
62. Schlafer DH. (2007). Equine endometrial biopsy: enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques? *Theriogenology* 68(3): 413-422.
63. Sharma S, Dhaliwal GS, Dadarwal D. (2010). Reproductive efficiency of Thoroughbred mares under Indian subtropical conditions: A retrospective survey over 7 years. *Animal Reproduction Science* 117: 241-248.
64. Sharp DC, Tatcher MJ, Salute ME, Fuchs AR. (1997). Relationship between endometrial oxytocin receptors and oxytocin-induced prostaglandin F2 alpha release during oestrus cycle and early pregnancy in pony mares. *Journal of Reproduction and Fertility* 109: 137-144.
65. Sosa C, Abecia J, Forcada F, Viñoles C, Tasende C, Valares JA, Palacín I, Martín B, Meikle A. (2006). Effect of undernutrition on uterine progesterone and oestrogen receptors and on endocrine profiles during the ovine oestrous cycle. *Reproduction Fertility and Development* 18: 447-458.
66. Sosa C. (2007). La subnutrición y el ambiente materno durante el ciclo sexual y la gestación temprana en ovinos. Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España.
67. Squires EL. (1993). Progesterone. En: McKinnon AO, Voss JL. (1993) *Equine Reproduction*. Ed. McKinnon AO, Voss JL. 2nd ed. Lea and Febiger. Philadelphia, Cap 6, pp.57-64.
68. Starbuck GR, Stout AE, Lamming GE, Allen WR, Flint APF. (1998). Endometrial oxytocin receptor and uterine prostaglandin secretion in mares during oestrus cycle and early pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility* 113:173-179.
69. Stout TAE, Rambags BPB, van Tol HTA, Colenbrander B. (2004). Low molecular weight proteins secreted by the early equine conceptus. *Havemeyer Foundation Monograph Series* 16: 50–52.
70. Threlfall WR. (1980). Broodmare Uterine Therapy. *The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 11: 5246-5254.
71. Tomanelli RN, Setich PL, Watson ED. (1991). Soluble oestrogen and progesterone receptors in the endometrium of the mare. *Journal of Reproduction and Fertility* 44: 267-273.
72. Traub-Dargatz JL, Salman MD, Voss JL. (1991). Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 198: 1745-1747.

73. Troedsson MHT, Ababneh MM, Ohlgren AF, Madill S, Vetscher N, Gregas, M. (2001). Effect of periovulatory prostaglandin F_{2α} on pregnancy rates and luteal function in the mare. *Theriogenology* 55: 1891-1899.
74. Troedsson MHT. (2006). Breeding-induced endometritis in mares. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 22: 705-712.
75. Van Camp SD. (1988). Endometrial biopsy in the mare. A review and update. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 4(2): 229-245.
76. Waelchli RO, Corboz L, Winder NC. (1987). Effect of intrauterine plasma infusion in the mare: histological, bacteriological and cytological findings. *Theriogenology* 28: 861-869.
77. Walker ME, Lillie BN, Quinn BA, McGuirk GA, Waelchli R, Betteridge KJ, Hayes MA (2009). Expression of EqIFN-β1, EqIFN-β2 and MX1 in normal and compromised early pregnancy in mares. 2009 Leadership and Research Program Abstracts. <http://journal.lib.uoguelph.ca/index.php/surg/article/view/article/1031/1527>. último acceso: 25/05/10.
78. Watson ED, Skolnik SB, Zanecosky HG. (1992). Progesterone and estrogen receptor distribution in the endometrium of the mare. *Theriogenology* 38: 575-580.
79. Weems CW, Weems YS, Randel RD. (2006). Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *The Veterinary Journal* 171: 206-228.
80. Zent WW, Troedsson MHT, Xue JL. (1998). Postbreeding Uterine fluid accumulation in a normal population of Thoroughbred mares: A Field Study. 44th AAEP Annual Convention, 6-9, December, Baltimore, Maryland, USA. pp: 64-65.